

**Genexpressionsanalysen in humanen peripheren
Blutlymphozyten nach Bestrahlung -
Grundlagen für biodosimetrische Applikationen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katja Knops
aus Tönisvorst

September, 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Forschungszentrum Jülich GmbH, im Strahlenbiologischen Labor des Geschäftsbereichs Sicherheit und Strahlenschutz, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis

2. Gutachter: Prof. Dr. Verena Jendrossek

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2012

Meiner Familie

Danksagung

Herrn Prof. Dr. George Iliakis danke ich für die interessante Themenstellung und für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Dr. Ralf Kriehuber danke ich für eine engagierte Betreuung und viele lehrreiche und hilfreiche Gespräche.

Außerdem danke ich Herrn Dipl.-Biol. Volker Dahmen für die Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den Technischen Assistenten Herrn Dominik Oskamp und Marcel von Ameln sowie allen anderen Mitarbeitern der AG Strahlenbiologie für das freundliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bedanken.

Besonderer Dank gilt außerdem dem Betriebsärztlichen Dienst des Forschungszentrums Jülich für die Durchführung unzähliger Blutabnahmen im Rahmen meiner Arbeit.

Herzlichster Dank gilt meinen Eltern für die tolle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Ionisierende Strahlung.....	1
1.2 Mechanismen der DNA-Schädigung.....	1
1.2.1 DNA-Schädigung durch die Einwirkung IR.....	2
1.2.2 DNA-Schädigung durch die Einwirkung von 4-Acetamidophenol und Mitomycin C	3
1.3 Akute Strahlenwirkung auf den menschlichen Gesamtorganismus	4
1.4 Die Biodosimetrie.....	6
1.5 Lymphozyten als biodosimetrisches Werkzeug	6
1.6 Methoden der Biodosimetrie	7
1.6.1 Zytogenetische Biodosimetrie	8
1.6.2 Genexpressionsbasierte Biodosimetrie	10
1.6.3 Biodosimetrie im Niedrigdosisbereich	12
1.7 Zelluläre Effekte der Einwirkung IR	13
1.7.1 P53 und die strahleninduzierte DNA-Schadensantwort	14
1.7.1.1 P53 und der Zellzyklusarrest.....	14
1.7.1.2 P53 und die Einleitung der Apoptose.....	15
1.8 Ziele der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien und Geräte	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Geräte.....	19
2.1.3 <i>Software</i>	20
2.1.4 <i>Kits</i>	21
2.1.5 <i>Primer</i>	21
2.1.6 Antikörper und Enzyme.....	22
2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Strahlen- und Chemikalienexposition.....	23
2.2.1.1 <i>Ex-vivo</i> γ -Bestrahlung von humanem Vollblut	23
2.2.1.2 Mitomycin C- und 4-Acetamidophenol Inkubation	24
2.2.2 Zellbiologische Methoden	24
2.2.2.1 Lymphozytenisolation aus humanem Vollblut und Zellzahlbestimmung.....	24
2.2.2.2 Kultivierung der Lymphozyten	26
2.2.3 Arbeiten mit RNA.....	26
2.2.3.1 Isolation der RNA aus Lymphozyten.....	26
2.2.3.2 Poolen der isolierten Gesamt-RNA	27
2.2.3.3 <i>Microarrays</i>	27
2.2.3.4 Quantitative <i>Real-time</i> PCR	30
2.2.3.5 Herstellung der cDNA.....	33
2.2.4 Arbeiten mit DNA.....	34
2.2.4.1 Polymerasekettenreaktion (Saiki <i>et al.</i> , 1988)	34
2.2.4.2 Agarosegelelektrophorese (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	35

2.2.5 Proteinchemische Methoden	36
2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten	36
2.2.5.2 Translationshemmung	37
2.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford (Bradford, 1976).....	37
2.2.5.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	38
2.2.5.5 Coomassie Brilliant-Blau-Färbung einer SDS-PAGE (Merril, 1990).....	39
2.2.5.6 Proteintransfer auf PVDF-Membran (Yuen et al., 1989).....	40
2.2.5.7 Ponceau-S-Färbung	40
2.2.5.8 Immunodetektion	40
2.2.5.9 Durchflusszytometrische Apoptosemessung.....	41
2.2.6 <i>Microarray</i> -Analyse	43
2.2.6.1 Filtern der <i>Microarray</i> -Daten.....	43
2.2.6.2 Statistische Analyse der <i>Microarray</i> -Proben	44
2.2.6.3 Funktionale Analyse signifikant veränderter Gene	44
2.2.6.4 Retrospektive Zuordnung von Strahlendosen	44
3 Ergebnisse	48
3.1 Charakterisierung der biologischen Wirkung von Hochdosisbestrahlung auf Lymphozyten	48
3.1.1 Bestimmung der Apoptoserate von Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung	48
3.1.2 Qualitätsbestimmung der RNA bestrahlter Lymphozyten.....	50
3.1.3 Signifikant veränderte Genexpressionen in Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung	50
3.1.4 Induzierte Signalwege nach Hochdosisbestrahlung.....	51
3.1.4.1 Induzierte Signalwege 6 h nach Hochdosisbestrahlung.....	52
3.1.4.2 Induzierte Signalwege 24 h nach Hochdosisbestrahlung	53
3.1.4.3 Induzierte Signalwege 48 h nach Hochdosisbestrahlung	55
3.1.4.4 Zusammenfassung der zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hochdosisbestrahlung induzierten Signalwege.....	56
3.1.5 Tiefgreifende Analyse der 6, 24 und 48 h nach Hochdosisbestrahlung induzierten Signalwege	58
3.1.5.1 Der P53-Signalweg	58
3.1.5.2 Der Systemische Lupus erythematosus Signalweg.....	61
3.1.5.3 Der Antigenprozessierungs und –präsentations Signalweg	61
3.1.6 Expressionsanalyse von Histogenen	64
3.2 Identifizierung von Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung	65
3.2.1 Validierung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse nach Hochdosisbestrahlung.....	67
3.2.1.1 Überprüfung der <i>Primer</i> -Spezifität	67
3.2.1.2 Validierung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse an gepoolten Proben	68
3.2.2 Charakterisierung der individuellen Expressionen	70
3.2.3 Vergleich der <i>Microarray</i> - und qRT-PCR-Expressionsdaten	72
3.2.4 Charakterisierung des Proteinstatus ausgewählter Genprodukte	74
3.2.4.1 Proteinquantifizierung von TNFSF4 nach Hochdosisbestrahlung.....	75
3.2.4.2 Proteinquantifizierung von FDXR nach Hochdosisbestrahlung	76
3.2.4.3 Proteinquantifizierung nach Translationshemmung.....	77
3.2.5 Untersuchung der Strahlenspezifität der identifizierten Markergene	79
3.2.5.1 Bestimmung der Apoptoserate von Lymphozyten nach 4-Acetamidophenol- und Mitomycin C Inkubation	79
3.2.5.2 Expressionsanalysen nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation	81

3.3 Charakterisierung der biologischen Wirkung von Niedrigdosisbestrahlung auf Lymphozyten	84
3.3.1 Bestimmung der Apoptoserate von Lymphozyten nach Niedrigdosisbestrahlung..	84
3.3.2 Identifizierung von Markergenen für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung	85
3.3.3 Validierung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse nach Niedrigdosisbestrahlung	87
4 Diskussion	89
4.1 Zelluläre und molekulare Effekte der Hochdosisbestrahlung in Lymphozyten	89
4.1.1 Apoptoserate nach Hochdosisbestrahlung	89
4.1.2 Genexpressionsanalysen in humanen Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung ..	90
4.1.3 Signalweganalysen signifikant veränderter Gene nach Hochdosisbestrahlung	91
4.1.3.1 Der P53-Signalweg und zellzyklusrelevante Gene	91
4.1.3.2 Der Signalweg der Antigenprozessierung und -präsentation	93
4.1.3.3 Der Systemische Lupus erythematoses Signalweg	94
4.1.3.4 Die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion	95
4.1.3.5 Zusammenfassung der aktivierten Signalwege	96
4.2 Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung	97
4.2.1 Funktion und Strahleninduktion der robustesten Markergene	97
4.2.2 Markergene mit geringen Expressionsänderungen	99
4.2.3 Vergleich der robustesten Markergene mit weiteren biodosimetrischen Studien ...	99
4.2.4 Anwendbarkeit <i>in vitro</i> generierter Markergene auf <i>in vivo</i> Dosisabschätzungen	100
4.2.5 Zusammenfassung der Anwendbarkeit <i>in vitro</i> identifizierter Markergene für die Biodosimetrie	101
4.3 Validierung der Expressionsänderungen identifizierter Markergene	101
4.3.1 QRT-PCR-basierte Validierung ausgewählter Markergene nach Hochdosisbestrahlung	102
4.3.2 Charakterisierung der individuellen Expressionen an ausgewählten Markergenen	103
4.3.3 Vergleich der Genexpressionsänderungen	104
4.4 Korrelation zwischen Transkription und Translation nach Bestrahlung	104
4.5 Zelluläre und molekulare Effekte der Inkubation mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C in Lymphozyten	106
4.5.1 Apoptoserate nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation	106
4.5.2 Genexpressionen nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation	107
4.6 Zelluläre und molekulare Effekte der Niedrigdosisbestrahlung in Lymphozyten	109
4.6.1 Apoptoserate nach Niedrigdosisbestrahlung	109
4.6.2 Markergene für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung	110
4.6.3 QRT-PCR-basierte Validierung ausgewählter Markergene nach Niedrigdosisbestrahlung	111
5 Zusammenfassung	113
6 Ausblick	115
7 Literaturverzeichnis	116
8 Anhang	134
8.1 Abbildungsverzeichnis	134
8.2 Tabellenverzeichnis	135
8.3 Tabellen der Genexpressionsänderungen signifikant veränderter Gene	137
9 Lebenslauf	145

10 Erklärungen.....	148
----------------------------	------------

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
C _t	<i>cycle threshold</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and integrated Discovery</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dn	<i>down</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Phosphat
FITC	Fluoresceinthiocyanat
g	Gramm
G ₀ -Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G ₁ -Phase	Erste <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
G ₂ -Phase	Zweite <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Merrettichperoxidase
IR	Ionisierende Strahlung
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
kg	Kilogramm
λ	Wellenlänge
LET	Linearer Energietransfer
LNT	<i>linear non-threshold model</i>

Abkürzungen

M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute(n)
mM	millimolar
ml	Milliliter
MMLV-RT	<i>murine leukemia virus</i> -Reverse Transkriptase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
M-Phase	Mitose-Phase
mSv	Millisievert
μ	micro
μg	Microgramm
n	nano
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NTP	Nukleotidtriphosphat
O.D.	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
S-Phase	Synthese-Phase
Sv	Sievert
Tab.	Tabelle
U	<i>Units</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

Abkürzungen

W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Ionisierende Strahlung

Der Zerfall instabiler Atomkerne erzeugt Teilchenstrahlung und elektromagnetische Strahlung, wobei γ -Strahlung Letzterer zugeordnet wird (Dainiak, 2002). Elektromagnetische Strahlung entsteht, wenn durch Teilchenstrahlung der Atomkern in einem angeregten und instabilen Zustand hinterlassen wird. Dabei wird die Anregungsenergie durch die Abgabe einer energiereichen elektromagnetischen Wellenstrahlung, auch γ -Quant oder Photon genannt, abgegeben, wonach der Atomkern in den Grundzustand übergeht.

Zudem wird γ -Strahlung der ionisierenden Strahlung (IR) zugeordnet, welche in „locker“ oder „dicht“ ionisierende Arten unterteilt wird (Dainiak, 2002), die durch die Größe des linearen Energie-Transfers (LET) definiert sind und über unterschiedliche biologische Wirksamkeiten verfügen. Unter dem LET wird die längs der Bahn pro Weglängeneinheit deponierte Energie verstanden, wobei γ -Strahlung einen niedrigen LET aufweist (Smith *et al.*, 2003), was bedeutet, dass durch γ -Strahlung aus dem Orbital herausgelöste Sekundärelektronen innerhalb ihrer Spur relativ wenige Ionisationen erzeugen. Die Reichweite der gelösten Elektronen kann dabei so hoch sein, dass das durchstrahlte Volumen von diesen verlassen wird. Die Beurteilung der Strahlenwirkung beruht jedoch lediglich auf der im Körper deponierten Energie, deren Maß die Dosis ist. Diese ist definiert als die in einem Volumenelement deponierte Energie dividiert durch seine Masse und wird als Gray (Gy) bezeichnet, wobei $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/Kg}$ ist (Kiefer & Kiefer, 2003). Die Äquivalentdosis ist eine auf die gleiche biologische Wirkung normierte Dosis, wozu die Energiedosis mit einem Bewertungsfaktor q multipliziert wird, der die relative biologische Wirksamkeit verschiedener Strahlenarten berücksichtigt (Feinendegen *et al.*, 2006). Die Äquivalentdosis wird in Sievert (Sv) angegeben (Pinto *et al.*, 2010) und bei einem niedrigen LET entspricht $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Sv}$ (Wakeford, 2004).

Insgesamt basiert die biologische Wirkung IR weitestgehend auf direkten oder indirekten Wechselwirkungen mit der DNA (Bolos, 2001).

1.2 Mechanismen der DNA-Schädigung

Nach Vilenchik und Knudson (2000) treten bei 37°C unter physiologischen Bedingungen pro Zelle pro Tag zwischen 14.400 und 21.600 einfach zu reparierende spontane DNA-Schäden

und nach Rich *et al.* (2000) etwa 100.000 Modifikationen der DNA auf, die in Schäden resultieren können. Eine Hauptursache für die endogene Schädigung der DNA sind dabei reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die beim Elektronentransfer von NADH oder FADH₂ zu molekularem Sauerstoff unter physiologischen Bedingungen generiert werden (Wei, 1998). Die aus dem Zellmetabolismus hervorgehenden ROS können Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und Chromosomenaberrationen verursachen (Halliwell & Aruoma, 1991). Aber auch exogene Faktoren, wie IR und Chemikalien, können die DNA schädigen.

1.2.1 DNA-Schädigung durch die Einwirkung IR

Durch IR induzierte Schäden der DNA sind auf direkte Ionisationen oder auf die indirekte Strahlenwirkung durch die Generierung von Radikalen zurückzuführen (Hada & Georgakilas, 2008; siehe Abb. 1). Die indirekte Strahlenwirkung basiert dabei auf der Hydrolyse von Wasser und ist von großer Bedeutung, da die Zelle zu etwa 80% aus Wasser besteht (Hall, 2000). Die in der Zelle vorhandenen Wassermoleküle werden ionisiert, wobei im initialen Reaktionsschritt ein Elektron (e^-) und ein ionisches Radikal (H_2O^+) entstehen. Da das ionische Radikal aufgrund der positiven Ladung und des ungepaarten Elektrons in der äußeren Hülle sehr reaktiv ist, reagiert es mit anderen Wassermolekülen, wodurch unter anderem ein Hydroxylradikal entsteht (Breen & Murphy, 1995), welches hauptsächlich für die Schädigung der DNA und der Zellmembran (Hosokawa *et al.*, 2002) nach Einwirkung niedriger LET-Strahlung verantwortlich ist (Breen & Murphy, 1995).

Aufgrund ihrer hohen Reaktivität besitzen Hydroxylradikale eine geringe Reichweite. Werden diese in einem kurzen Abstand von nur wenigen Nanometern zur DNA gebildet, so verursachen die Hydroxylradikale eine Vielzahl von DNA-Schäden (Olive, 1998). Durch die Einwirkung von 1 Gy niedriger LET-Strahlung werden beispielsweise etwa 1000 DNA-Einzelstrangbrüche und etwa 40 DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt (Goodhead, 1994; Ward, 1988).

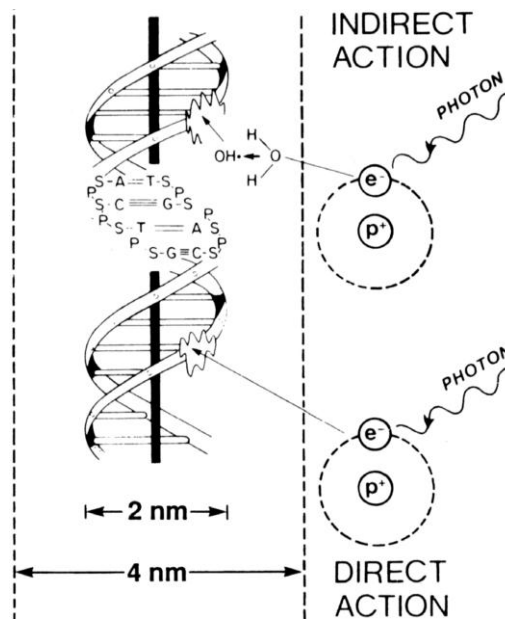


Abb. 1: Darstellung der direkten und indirekten Wirkung IR auf die DNA. Beim direkten Effekt wird ein Hüllelektron durch ein Photon aus einem Atom gelöst, welches direkt mit der DNA wechselwirkt. Beim indirekten Effekt führt das durch das Photon aus der Hülle gelöste Elektron durch die Wechselwirkung mit Wasser zur Bildung von Hydroxylradikalen, welche mit der DNA reagieren und diese so schädigen (aus Hall, 2000).

1.2.2 DNA-Schädigung durch die Einwirkung von 4-Acetamidophenol und Mitomycin C

DNA-Schäden werden außerdem durch bestimmte Chemikalien induziert (Khan *et al.*, 2009), die unter anderem als Medikamente Einsatz in der Behandlung verschiedener Erkrankungen finden.

4-Acetamidophenol, bekannt unter dem Namen Paracetamol (Saha *et al.*, 2008), besitzt das Potenzial zur Induktion akuter und chronischer genotoxischer Effekte (Hongslo & Holme, 1994), wobei die Einnahme einer Überdosis zudem eine hepatotoxische Wirkung aufweist (Hamm, 2000; Stocker & Montgomery, 2001). Der genaue Mechanismus, durch den 4-Acetamidophenol die DNA schädigt, ist bis heute nicht geklärt. Ein Grund für die Schädigung der DNA könnte die kovalente Bindung von 4-Acetamidophenol-Intermediaten an die DNA sein (Hongslo & Holme, 1994; Rannug *et al.*, 1995). Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass 4-Acetamidophenol die Ribonukleotidreduktase inhibiert, wodurch die Balance des Desoxyribonukleotid-Pools gestört wird (Rannug *et al.*, 1995). Dies stellt ein Signal für die Induktion einer Endonuklease dar, die ihrerseits Doppelstrangbrüche induziert (Yoshioka *et al.*, 1987).

Das Zytostatikum Mitomycin C findet Anwendung in der Chemotherapie (Kahmann *et al.*, 2010) zur Behandlung verschiedenster Krebsarten, wie beispielsweise in der Behandlung von

Blasenkrebs (Ferro *et al.*, 2012) oder von Gebärmutterhalskrebs (Huang *et al.*, 2001). Die DNA-schädigende Wirkung von Mitomycin C beruht darauf, dass es Guanin in der DNA modifiziert, wodurch inter- und intrachromosomale Verbindungen entstehen, die den Fortgang von Replikation und Transkription verhindern (Yoshikiyo *et al.*, 2010). Eine weitere Folge der unterschiedlichen Kreuzverbindungen ist die Induktion von Chromatidaustauschen in der Nähe des Zentromers sowohl zwischen homologen als auch zwischen nicht-homologen Chromosomen (Kusakabe *et al.*, 1999), was zu Mutationen und zum Verlust genetischer Informationen führen kann.

1.3 Akute Strahlenwirkung auf den menschlichen Gesamtorganismus

Die Einwirkung von IR führt zu unterschiedlichen Formen der Zellschädigung, wobei der DNA-Doppelstrangbruch die kritischste Läsion in der Zelle darstellt (Jackson, 2002). Bei der Betrachtung des menschlichen Organismus zeigt sich, dass die im Körper vorliegenden verschiedenen Zelltypen über unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten aufgrund unterschiedlicher DNA-Reparaturkapazitäten verfügen (Dhariwala *et al.*, 2012). Periphere Blutlymphozyten und Stammzellen beispielsweise sind sehr strahlensensibel (Leonard *et al.*, 2005), wohingegen Knochenzellen und Bindegewebszellen eine geringe Strahlensensitivität aufweisen. Strahlensensible Zellen zeigen nach der Einwirkung von IR auf den menschlichen Gesamtorganismus eine höhere Apoptoserate als strahlenresistente Zellen (Bolus, 2001). Je nach der Höhe der auf den Organismus wirkenden Strahlendosis ergeben sich deshalb die in Tab. 1 aufgeführten klinischen Symptome und Prognosen nach akuter Ganzkörperbestrahlung ohne Behandlung (Waselenko *et al.*, 2004):

Tab. 1: Dosisabhängige Erscheinungsformen der Strahlenkrankheit (modifiziert nach Waselenko *et al.*, 2004; KMS: Knochenmarkschädigung; GIS: Gastrointestinales Syndrom)

Dosis (Gy)	Symptome	Prognose (ohne Therapie)
0,5 – 1	Geringe Abnahme der Blutzellen	Fast sicheres Überleben
1 – 2	Geringe KMS	Hohe Überlebensrate (> 90% der Opfer)
2 – 3,5	Mäßige bis starke KMS	Wahrscheinliches Überleben
3,5 – 5,5	Starke KMS; geringes GIS	Tod innerhalb von 3,5 – 6 Wochen (50% der Opfer)
5,5 – 7,5	Pancytopenie; mäßiges GIS	Wahrscheinlicher Tod innerhalb von 2 – 3 Wochen
7,5 – 10	Starkes GIS; KMS; Hypotension	Wahrscheinlicher Tod innerhalb von 1 – 2,5 Wochen
10 – 20	Starkes GIS; Pneumonitis; kognitive Dysfunktion	Sicherer Tod innerhalb von 5 – 10 Tagen
20 – 30	Zerebrovaskulärer Kollaps; Fieber; Schock	Sicherer Tod innerhalb von 2 – 5 Tagen

Die Höhe der akuten Strahlendosis ist ausschlaggebend für die in den Tagen nach der Bestrahlung eintretenden Erscheinungsformen der Strahlenkrankheit und für die Prognose. Die nach einer akuten Bestrahlung auftretenden Symptome können jedoch deutlich gelindert und die Prognose für die betroffenen Personen deutlich verbessert werden, wenn eine der Strahlendosis angemessene Behandlung eingeleitet wird. So wird das hämatopoetische Syndrom beispielsweise mit der Gabe von Cytokinen (Herodin & Drouet, 2005), Bluttransfusionen und nach Strahlendosen > 7 Gy mit einer Stammzelltransplantation behandelt (Klymenko *et al.*, 2011; Waselenko *et al.*, 2004). Die Behandlung des gastrointestinalen Syndroms erfolgt durch die Gabe von Antiemetika und elektrolythaltigen Infusionen (Waselenko *et al.*, 2004).

Damit nach einem radiologischen Unfall oder einem terroristischen Anschlag jedem Betroffenen die bestmögliche medizinische Versorgung geboten werden kann (Flood *et al.*, 2011), muss vor dem Behandlungsbeginn die individuelle Strahlendosis involvierter Personen bestimmt werden (Paul & Amundson, 2008). Dabei muss bei Personen, die während der Bestrahlung nicht über physikalische Dosimeter verfügt haben, eine Dosisabschätzung unter Anwendung biodosimetrischer Methoden erfolgen, wodurch die exponierten Personen folgenden Kategorien zugeteilt werden: Der ersten Kategorie werden Personen zugeordnet, die mit geringen Dosen bestrahlt worden sind und bei denen keine deterministischen Effekte erwartet werden. Die zweite Kategorie umfasst Personen, die mit mittleren Dosen bestrahlt

worden sind und medizinisch behandelt werden müssen, damit keine strahleninduzierten Schäden auftreten. Die dritte Kategorie hingegen beinhaltet Personen, die ohne sofortige medizinische Intensivversorgung mit hoher Wahrscheinlichkeit den Folgen der Strahlenkrankheit erliegen werden (Ainsbury & Barquinero, 2009).

1.4 Die Biodosimetrie

Die Biodosimetrie ist definiert als die Bestimmung der Strahlendosis nach Exposition mit IR (Swartz *et al.*, 2010) anhand von biologischen Markern, die eine Aussage über die Höhe der individuellen Strahlendosis erlaubt (Simon *et al.*, 2010). Biodosimetrische Methoden finden Anwendung, wenn während eines radiologischen Unfalls eine große Anzahl von Personen ohne individuelle Dosimeter exponiert werden (Pinto *et al.*, 2010).

Die Anforderungen an biodosimetrische Methoden bestehen darin, dass sie nach einem radiologischen Unfall, bei der Störung des gewöhnlichen, sozialen und medizinischen Transportsystems, schnell und effektiv anwendbar sein müssen (Swartz *et al.*, 2010). Des Weiteren sollte eine auf Biomarkern basierende Methode einfach durchzuführen sein und für die Auswertung kein hochqualifiziertes Fachpersonal benötigt werden. Außerdem sollte das biodosimetrische Assay Potenzial zur Automatisierung besitzen (Pellmar & Rockwell, 2005). Auch die für die Biodosimetrie selektierten Biomarker müssen einigen Anforderungen entsprechen: Zum einen sollten diese spezifisch auf IR reagieren und dabei eine klare Dosis-Antwort-Beziehung aufweisen (Amundson *et al.*, 2001a). Zum anderen sollten die Biomarker sowohl leicht zu gewinnen als auch verlässlich sein und die auf den Biomarkern basierende Dosis einschätzung innerhalb eines Tages nach Bestrahlung vorliegen (Rehakova *et al.*, 2008).

1.5 Lymphozyten als biodosimetrisches Werkzeug

Besonders geeignet für die Identifizierung biodosimetrischer Marker sind das periphere Blut und die darin enthaltenen unterschiedlichen Zelltypen, da es wiederholt und in definierten Zeitintervallen nach der Bestrahlung gewonnen werden kann, ohne dabei der betroffenen Person zu schaden. Außerdem gehört das hämatopoetische System zu dem radiosensitiven System im Körper, wobei die Leukozyten und ihre Subpopulationen in Bezug auf ihren Phänotyp und ihre Funktion sehr gut charakterisiert sind (Rehakova *et al.*, 2008).

Lymphozyten stellen die radiosensitivste Population der Leukozyten dar (Chambers *et al.*, 1998; Harrington *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 2005), die in ihren Subpopulationen, unterteilt in CD3⁺ T-Lymphozyten, CD19⁺ B-Lymphozyten und CD56⁺ natürliche Killerzellen (Al-Awadhi *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2005), wiederum unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber IR aufweisen (Louagie *et al.*, 1999; Philippe *et al.*, 1997; Wilkins *et al.*, 2002). Natürliche Killerzellen bilden die resistanteste Subpopulation nach Einwirkung von IR (Mori *et al.*, 2005), wohingegen B-Lymphozyten die sensitivste Subpopulation darstellen (Dehos *et al.*, 1994; Louagie *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2003) und folglich eine höhere Radiosensitivität als T-Lymphozyten aufweisen (Dehos *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 2003; Wilkins *et al.*, 2002).

Lymphozyten eignen sich besonders gut als biodosimetrisches Werkzeug, da sie äußerst strahlensensibel und einfach aus dem Vollblut zu isolieren sind (Amundson *et al.*, 2003). Des Weiteren befinden sich Lymphozyten in der ruhenden Phase (G₀) des Zellzyklus (Mayer *et al.*, 2002; Vilasova *et al.*, 2008; Yusuf & Fruman, 2003), weshalb durch IR induzierte DNA-Schäden latent in diesen existieren können (Facchino *et al.*, 2010; Fringer & Grinnell, 2003; Pinto *et al.*, 2010).

Aus diesen Gründen basieren die meisten derzeit zur Verfügung stehenden zytogenetischen und molekularen biodosimetrischen Methoden auf der Untersuchung von Lymphozyten (Belloni *et al.*, 2005).

1.6 Methoden der Biodosimetrie

Biodosimetrische Methoden werden angewendet, um die individuelle Strahlendosis von Personen abzuschätzen, die durch einen radiologischen Unfall oder einen terroristischen Anschlag exponiert worden sind und währenddessen nicht über physikalische Dosimeter verfügt haben (Ghardi *et al.*, 2012). Derzeit wird in der Biodosimetrie vorwiegend auf zytogenetische Methoden zurückgegriffen. Aber auch modernste Hochdurchsatzverfahren, die unter anderem die Untersuchung des Transkriptoms ermöglichen, bieten ein hohes Potenzial zur Identifizierung von Indikatorgenen, die für den Einsatz in der Biodosimetrie geeignet sind (Pandey *et al.*, 2010).

1.6.1 Zytogenetische Biodosimetrie

Das dizentrische Assay

Den Goldstandard in der zytogenetischen Biodosimetrie bildet derzeit das dizentrische Assay (Pujol *et al.*, 2012), welches das für die durch IR hervorgerufenen Schäden spezifischste Assay darstellt (Hoffmann & Schmitz-Feuerhake, 1999). Das dizentrische Assay beruht dabei auf der starken klastogenen Wirkung von IR (Mosse *et al.*, 2000), wodurch Chromosomenbrüche induziert werden, die in zytogenetischen Aberrationen resultieren (Amundson *et al.*, 2001a; Bauchinger *et al.*, 1975). Für die Durchführung des dizentrischen Assays werden Lymphozyten aus dem Blut bestrahlter Person isoliert (Wilkins *et al.*, 2011) und in Kultur zur Zellteilung stimuliert. Die Metaphasechromosomen der stimulierten Lymphozyten werden anschließend mit zentromerspezifischen Sonden markiert und Chromosomen mit zwei Zentromeren gezählt (siehe Abb. 2). Die individuelle Strahlendosis wird dann durch den Vergleich mit einer durch *in vitro* Bestrahlung von Lymphozyten generierten Standardkurve abgeschätzt (Amundson *et al.*, 2001a), wobei die untere Nachweisgrenze nach akuter Ganzkörperbestrahlung bei 0,1 Gy liegt (Vral *et al.*, 2011).

Die Nachteile des dizentrischen Assays bestehen darin, dass für zuverlässige Aussagen über Niedrigdosisbestrahlungen etwa 1000 Metaphasen zeitaufwendig ausgewertet werden müssen. Des Weiteren kann die erhaltene Strahlendosis überschätzt werden, da die *in vitro* Bestrahlung von Lymphozyten zur Generierung der Standardkurve zu einer höheren Anzahl dizentrischer Chromosomen als die *in vivo* Bestrahlung führt (Steinstrasser & Kemmer, 1981). Der größte Nachteil des dizentrischen Assay besteht jedoch darin, dass es bei radiologischen Unfällen mit der Beteiligung vieler Personen nicht anwendbar ist, da es eine insgesamt sehr zeitaufwendige Methode darstellt und für die Auswertung hochqualifiziertes Fachpersonal benötigt wird (Paul *et al.*, 2011; Romm *et al.*, 2011).

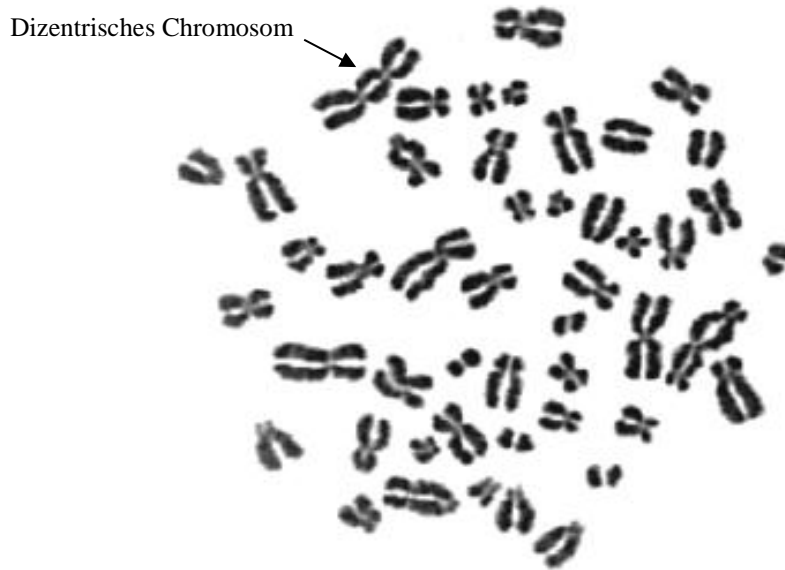


Abb. 2: Analyse dizentrischer Chromosomen in der Metaphase. Die durch die klastogene Wirkung von IR induzierten Chromosomenbrüche können in Chromosomenaberrationen resultieren, wobei die Bildung von dizentrischen Chromosomen ein Maß für die Dosisabschätzung exponierter Personen darstellt. Der Anteil an dizentrischen Chromosomen nimmt dabei mit steigender Strahlendosis zu (aus Terzoudi & Pantelias, 2006).

Das Mikrokernassay

Auch das Mikrokernassay basiert auf der Detektion von Chromosomenaberrationen in den Lymphozyten bestrahlter Personen. Dabei werden die Lymphozyten nach der Bestrahlung aus dem Blut isoliert, in Kultur stimuliert und die Zytokinese blockiert (Amundson *et al.*, 2001a; Garty *et al.*, 2010). Die erfolgte Karyokinese ohne Zytokinese ermöglicht die Quantifizierung von mikrokernhaltigen binukleären Zellen, wobei die Mikrokerne Chromosomenbruchstücke enthalten und ein Maß für die individuelle Strahlendosis darstellen (siehe Abb. 3).

Die Vorteile des Mikrokernassays liegen darin, dass es einfach und schnell durchzuführen ist (Vral *et al.*, 2011), für die Auswertung kein qualifiziertes Fachpersonal benötigt wird und schon Strahlendosen zwischen 0,1 und 0,2 Gy bestimmt werden können (Thierens *et al.*, 1999; Vral *et al.*, 1997). Der Nachteil besteht jedoch darin, dass Mikrokerne nicht spezifisch durch die Einwirkung IR, sondern auch durch Chemikalien mit klastogener Wirkung induziert werden (Fenech, 2006; Simkó *et al.*, 1998).



Abb. 3: Darstellung einer binukleären Zelle mit Mikrokern. Die durch die Einwirkung von IR induzierten Doppelstrangbrüche der DNA können in Chromosomenaberrationen resultieren, die nach der Karyokinese als Mikrokerne sichtbar werden und ein Maß für die individuelle Strahlendosis darstellen (aus Terzoudi & Pantelias, 2006).

1.6.2 Genexpressionsbasierte Biodosimetrie

Ein vielversprechender Ansatz für eine schnelle und zuverlässige Bestimmung der individuellen Strahlendosis sind Hochdurchsatzverfahren, durch die zeit- und dosisabhängige Genexpressionsprofile für biodosimetrische Applikationen detektiert werden können (Amundson *et al.*, 2000). Aufgrund ihrer Strahlensensitivität werden vorwiegend Lymphozyten verwendet, um an diesen die Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung zu untersuchen (Amundson *et al.*, 2000; Amundson *et al.*, 2001b; Dressman *et al.*, 2007). In Genexpressionsstudien wird dabei nach Markergenen gesucht, die für biodosimetrische Applikationen in einem medizinisch relevanten Dosisbereich geeignet sind und eine lineare Dosis-Antwort-Beziehung aufweisen, damit die für das jeweilige Gen detektierte Genexpression einer bestimmten Strahlendosis zugeordnet werden kann.

Bislang wurden in Genexpressionsstudien nach *ex vivo* Bestrahlung humaner Lymphozyten einige Gene identifiziert, die eine lineare Dosis-Antwort-Beziehung (Amundson *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2003) oder eine Dosispezifität aufweisen (Turtoi *et al.*, 2008). Die umfangreichste Genexpressionsstudie zur Identifizierung von Markergenen wurde dabei von Paul und Amundson (2008) durchgeführt. In dieser Studie wurde ein Set von 74 Genen identifiziert, welches den Ausgangspunkt für ein von Brengues *et al.* (2010) entwickeltes biodosimetrisches Assay darstellt. Für das Assay wurden 14 der 74 Gene, die die höchste differentielle Expression nach Bestrahlung zwischen 0,2 und 2 Gy und zudem einen linearen Expressionsanstieg bis 48 h nach Bestrahlung aufwiesen (Amundson *et al.*, 2001b; Paul & Amundson, 2008), selektiert. Spezifische Sequenzen dieser 14 Gene, zusammen mit

Sequenzen für das Haushaltsgen *GAPDH* und die Negativkontrolle *ANT*, wurden anschließend auf einem *Array* fixiert. Die Bestimmung der individuellen Strahlendosis erfolgt, indem aus dem Blut bestrahlter Personen die RNA isoliert, auf den *Array* aufgetragen und über Nacht auf diesem inkubiert wird. Dabei binden spezifische Sonden zu der aus dem Blut isolierten RNA an komplementäre Sequenzen der 16 auf dem *Array* befindlichen Gene. Die gebundenen Sonden werden anschließend mit Detektionslinkern sichtbar gemacht, wodurch eine Quantifizierung der gebundenen Sonden ermöglicht wird, die durch den Vergleich mit zuvor generierten Standardkurven eine Einschätzung der individuellen Strahlendosis erlaubt (Bregues *et al.*, 2010; siehe Abb. 4).

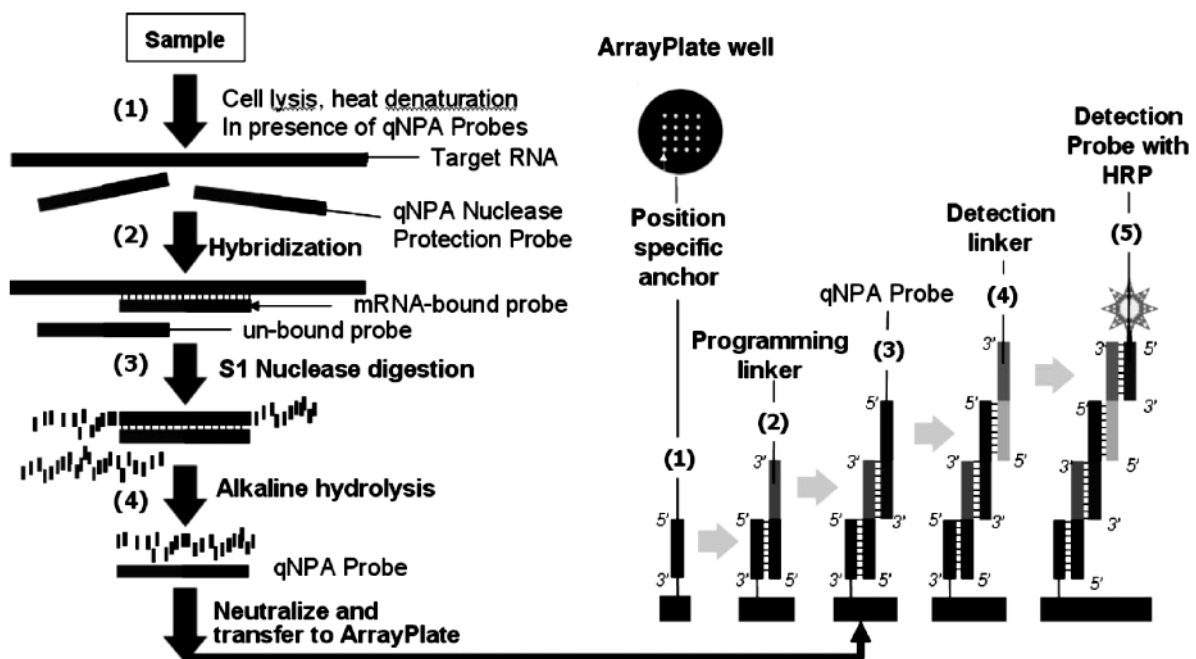


Abb. 4: Darstellung eines auf Genexpressionen basierenden biodosimetrischen Assays. Nach der Lyse der Blutzellen (1l) hybridisieren spezifische Sonden an die freigewordene RNA (2l). Der Komplex, bestehend aus RNA-Probe und Sonde, wird dann alkalisch hydrolysiert, wobei die RNA-Probe vollständig degradiert wird und nur die spezifische Sonde erhalten bleibt (4l). Anschließend hybridisiert die Sonde an eine auf dem Array befindliche komplementäre Sequenz (1-3r) und wird mit Detektionslinkern über die Kopplung der Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht (4, 5r). Dabei gibt die Intensität des Signals Auskunft über die Menge an gebundener Sonde, die ein Maß für die Dosisabschätzung darstellt (aus Bregues *et al.*, 2010; l: Nummerierung auf der linken Seite der Abbildung; r: Nummerierung auf der rechten Seite der Abbildung).

Der Vorteil des Assays besteht darin, dass es in hohem Durchsatz durchgeführt werden kann, wobei etwa 200.000 Proben pro Woche mit geringen Kosten von ca. 7\$ pro Probe untersucht werden können. Des Weiteren werden für das Assay lediglich 30 µl Blut benötigt und die Ergebnisse über die Dosisabschätzung liegen in weniger als 12 h vor. Das Assay befindet sich jedoch noch in der Entwicklungsphase und wurde bislang erst auf die Anwendbarkeit 24 h nach *in vitro* Bestrahlung mit 0, 2 und 8 Gy geprüft, wobei zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben unterschieden werden konnte (Bregues *et al.*, 2010). Des Weiteren

müssen zusätzliche Gensets für die Einschätzung geringerer Strahlendosen und längerer Zeiträume nach Bestrahlung identifiziert werden.

1.6.3 Biodosimetrie im Niedrigdosisbereich

Bislang stellen Einschätzungen über Bestrahlungen im Niedrigdosisbereich, also Bestrahlungen unter 0,1 Sv (Matsumoto *et al.*, 2007), die größte Herausforderung dar, da die momentan zur Verfügung stehenden, meist zytogenetischen Methoden erst zuverlässige Abschätzungen der individuellen Strahlendosis ab einer Bestrahlung von 0,1 Gy erlauben (Gruel *et al.*, 2008).

Gegenwärtige Modelle für die Einschätzung der Risiken, die von IR im Niedrigdosisbereich ausgehen, basieren auf dem linearen LNT-Modell (Jin *et al.*, 2008; Tubiana *et al.*, 2009). Dabei werden Daten von mit hohen Dosen bestrahlten Personen auf den Niedrigdosisbereich extrapoliert, woraus hervorgeht, dass schon kleinste Strahlendosen ein Krebsrisiko darstellen (Mullenders *et al.*, 2009) und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Krebserkrankung linear mit der Strahlendosis ansteigt.

Die meisten Bestrahlungsszenarien führen zu individuellen Strahlendosen unter 0,1 Gy, wobei in computertomographisch diagnostischen Untersuchungen Körperdosen von 0,012 Gy sowie Kopfdosen von 0,02 Gy pro Untersuchung erreicht werden (Huda & Ogden, 2008) und der Grenzwert für beruflich strahlenexponierte Personen 20 mSv/Jahr beträgt (Sudprasert *et al.*, 2006). Häufig werden jedoch Mehrfachuntersuchungen durchgeführt, wobei kumulative Dosen bis zu 580 mSv pro Patient auftreten können (Griffey & Sodickson, 2009). Die Bestimmung der individuellen Strahlendosis im Niedrigdosisbereich ist dabei nicht erforderlich, um eine Entscheidung über die medizinische Behandlung exponierter Personen treffen zu können. Jedoch können diese Untersuchungen dazu dienen, durch die Einwirkung von IR hervorgerufene Nebenwirkungen im Niedrigdosisbereich zu identifizieren (Dressman *et al.*, 2007), die letztlich Rückschlüsse auf die Risiken kleiner Strahlendosen (0 – 0,1 Gy) liefern könnten.

Da bislang keine genauen Kenntnisse über die durch Niedrigdosisbestrahlung hervorgerufenen Effekte und gesundheitlichen Risiken vorliegen, ist es deshalb von großem Nutzen, Markergene für biodosimetrische Applikationen im Niedrigdosisbereich zu identifizieren, die, im Gegensatz zu zytogenetischen Methoden, auch in diesem Dosisbereich verlässliche Einschätzungen der individuellen Strahlendosis erlauben.

1.7 Zelluläre Effekte der Einwirkung IR

Die zeit- und dosisabhängigen Genexpressionsänderungen, auf welchen die genexpressionsbasierte Biodosimetrie in Lymphozyten beruht, resultieren daraus, dass IR Biomoleküle schädigt und daraufhin in der Zelle Änderungen in der Genexpression induziert werden (Chaudhry, 2008). Diese Genexpressionsänderungen sind dabei auf DNA-Schäden zurückzuführen, wobei der Doppelstrangbruch nach der Einwirkung von IR die kritischste Läsion der DNA darstellt (Jackson, 2002; Tomita, 2010). Als Antwort auf einen strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbruch wird die Expression von Genen verändert, deren Proteine in eine Signaltransduktionskaskade involviert sind, die aus Sensor-, Transducer- und Effektor-Proteinen besteht (Zhou & Elledge, 2000). Der DNA-Schaden wird dabei von Sensor-Proteinen erkannt, die entweder direkt an der Behebung mitwirken oder ein Signal an Transducer-Proteine weiterleiten, die ihrerseits die Phosphorylierung von Zielproteinen, den Effektor-Kinasen, vornehmen (Fei & El-Deiry, 2003). Die Effektor-Proteine leiten letztlich Reparaturmechanismen zur Beseitigung des DNA-Schadens, einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose ein (Dhariwala *et al.*, 2012; Khanna & Jackson, 2001; Kinsella, 2009; Rich *et al.*, 2000; siehe Abb. 5).

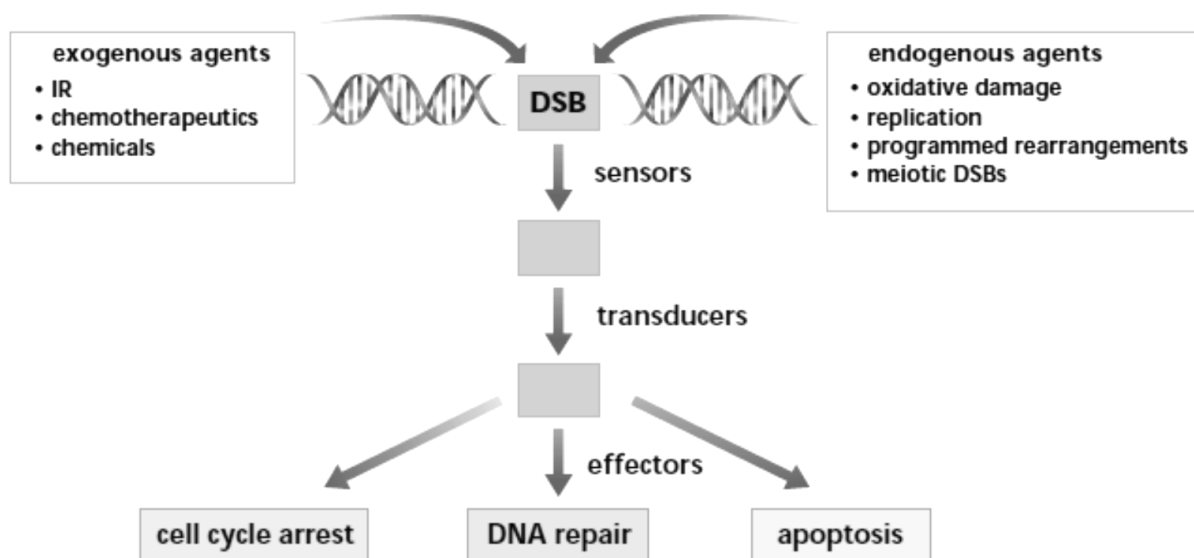


Abb. 5: Induktion der zellulären Schadensantwort nach Einwirkung IR. Durch die Einwirkung von IR können Doppelstrangbrüche in der DNA induziert werden, deren Vorhandensein über Sensor- an Transducer-Proteine und von diesen zu Effektor-Proteinen weitergeleitet wird. Die Effektor-Proteine induzieren letztlich die DNA-Reparatur, den Zellzyklusarrest oder bei schwerer Schädigung der DNA die Apoptose (modifiziert nach Khanna & Jackson, 2001).

1.7.1 P53 und die strahleninduzierte DNA-Schadensantwort

Eine Schlüsselrolle in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden (Belloni *et al.*, 2005) nach Einwirkung von IR spielt das Tumorsuppressorprotein P53 (Biegging & Attardi, 2012), welches die DNA-Reparatur mit dem Fortschreiten des Zellzyklus und dem Einleiten der Apoptose koordiniert (Fei & El-Deiry, 2003; Green & Chipuk, 2006). Unter physiologischen Bedingungen besitzt der Transkriptionsfaktor P53 eine Halbwertszeit von nur 5 bis 30 min (Moll & Petrenko, 2003). Die geringe Halbwertszeit von P53 ist dabei auf die Bindung der E3 Ubiquitinligase MDM2 an P53 und auf die damit verbundene Ubiquitinierung von P53 zurückzuführen (Di *et al.*, 2011), was den Transport des Proteins aus dem Zellkern und den Abbau durch das Proteasom bewirkt (Allende-Vega & Saville, 2010). Nach Schädigung der DNA durch genotoxischen Stress wird P53 entweder direkt durch ATM (Meulmeester *et al.*, 2005) oder indirekt über CHK2 phosphoryliert (Chehab *et al.*, 2000; Jeggo & Lobrich, 2006; Shieh *et al.*, 2000), wodurch P53 von der Ubiquitinligase MDM2 dissoziiert und die Ubiquitinierung verhindert wird (Hirao *et al.*, 2000). P53 akkumuliert in der Zelle (Fei & El-Deiry, 2003) und ist nach der Stabilisierung besonders am Zellzyklusarrest und nach schwerer Schädigung der DNA an der Einleitung der Apoptose beteiligt.

1.7.1.1 P53 und der Zellzyklusarrest

Das Fortschreiten des Zellzyklus hängt von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) ab (Warmerdam *et al.*, 2009), wobei erst ein aktiver Cyclin-CDK-Komplex den Fortgang des Zellzyklus erwirken kann. Nach Induktion eines Doppelstrangbruchs durch IR wird in proliferierenden Zellen der Übergang von der G₁- in die S-Phase durch die Stabilisierung von P53 unterbunden. Dabei aktiviert P53 die Transkription des CDK-Inhibitors *P21*, was zu einer Akkumulation von P21 in der Zelle und der Bindung des Proteins an den CDK2/Cyclin E-Komplex führt (Bartek & Lukas, 2001; El-Deiry *et al.*, 1994). Da CDK2/Cyclin E für die Phosphorylierung des Retinoblastom (RB)-Proteins verantwortlich ist, erfolgt durch die Inhibition des Komplexes keine Hyperphosphorylierung von RB. Infolge dessen bindet das RB-Protein an den Transkriptionsfaktor E2F1, wodurch wichtige für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigte Proteine nicht mehr transkribiert und der Zellzyklusarrest in der G₁-Phase bewirkt wird (Cobrinik, 2005; Giacinti & Giordano, 2006).

Des Weiteren kann ein G₂/M-Arrest durch P53 vermittelt werden, der durch die P53 Effektor-Proteine 14-3-3 σ (Ferguson *et al.*, 2000) und GADD45 induziert wird. 14-3-3 σ sequestriert

dabei die Proteine Cyclin B1 und CDK1, die die Mitose einleiten, im Cytoplasma, wodurch der Eintritt dieser in den Zellkern unterbunden wird (Chan *et al.*, 1999). Zudem inhibiert GADD45 die Aktivität des CDK1/Cyclin B-Komplexes (Zhan *et al.*, 1999) und P53 reprimiert die Expression von *CDK1* (Taylor & Stark, 2001), was in einem G₂/M-Arrest resultiert.

1.7.1.2 P53 und die Einleitung der Apoptose

Eine starke Schädigung der DNA nach Einwirkung von IR führt zur Einleitung der Apoptose, welche sich besonders durch Zellschrumpfung und Chromatinaggregation mit umfangreicher genomischer Fragmentierung auszeichnet (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980). Die Induktion der Apoptose erfolgt dabei entweder mitochondrial (Green & Reed, 1998) über den intrinsischen Signalweg oder rezeptorvermittelt (Ashkenazi & Dixit, 1998) über den extrinsischen Signalweg. Die P53-abhängige Apoptose wird dabei meist über die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen reguliert, die sowohl an der mitochondrial- als auch an der rezeptorvermittelten Apoptose beteiligt sind (Burns & El-Deiry, 1999; siehe Abb. 6).

Beim intrinsischen Signalweg der Apoptose aktiviert P53 die Transkription der pro-apoptotischen Gene der BCL2-Proteinfamilie *BAX*, *PUMA* und *NOXA* (Oda *et al.*, 2000; Reinhardt & Schumacher, 2012; Wu & Deng, 2002), wohingegen das anti-apoptotische Gen *BCL2* durch P53 reprimiert wird (Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita & Reed, 1995). Die Wechselwirkung von BAX, BCL2, PUMA und NOXA an der Mitochondrienmembran bedingt schließlich die Freisetzung von Cytochrom c (Wu & Deng, 2002). Zudem besitzt P53 eine transkriptions-unabhängige Funktion während der Apoptose, die nach der Einwirkung eines genotoxischen Stimulus in der Translokation von P53 zu den Mitochondrien und der dortigen Bindung an BAK besteht, was die Oligomerisierung von BAK induziert (Pietsch *et al.*, 2008). Anschließend erfolgt eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch das im Intermembranraum befindliche Cytochrom c ins Zytoplasma abgegeben wird (Dunkle & He, 2011). Cytochrom c bindet zusammen mit dATP an APAF-1, das dadurch seine Konformation ändert, was zu einer Aktivierung der Caspase-Rekrutierungs-Domäne führt. Die inaktive Procaspase-9 wird rekrutiert und bildet in aktiver Form zusammen mit Cytochrom c, APAF-1 und dATP das Apoptosom (Zou *et al.*, 1999). Durch die Caspase-9 werden anschließend die Procaspasen 3 und 7 aktiviert (Ryder *et al.*, 2007), die ihrerseits am

Abbau zellulärer Bestandteile mitwirken, aber auch für die Aktivierung von Zielproteinen verantwortlich sind, die eine Fragmentierung der DNA bewirken.

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung spezifischer Liganden an oberflächenlokalisierte Rezeptoren, auch bekannt als Todesrezeptoren, aktiviert (Kantari & Walczak, 2011). P53 ist dabei für die transkriptionelle Aktivierung der Todesrezeptoren *CD95*, *KILLER/DR5* und *PERP* verantwortlich (Attardi *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 1998). Der extrinsische Signalweg der Apoptose beruht letztlich darauf, dass der Ligand an seinen spezifischen Rezeptor bindet, wodurch dessen Oligomerisierung bewirkt wird und es zur Rekrutierung des Adapters FADD kommt. Dabei interagieren die Todesdomänen von FADD und des Rezeptors, was die Rekrutierung der Procaspase-8 und -10 zur cytoplasmatischen Todesdomäne des Rezeptors bewirkt (Kantari & Walczak, 2011). Der von FADD und Procaspase-8 gebildete Komplex wird als DISC (*death-inducing signal complex*) bezeichnet und bewirkt die Aktivierung der Procaspase-8, die ihrerseits die Procaspase-3 aktiviert (Ryter *et al.*, 2007), wodurch die Caspasekaskade in Gang gesetzt und infolge dessen die Apoptose eingeleitet wird.

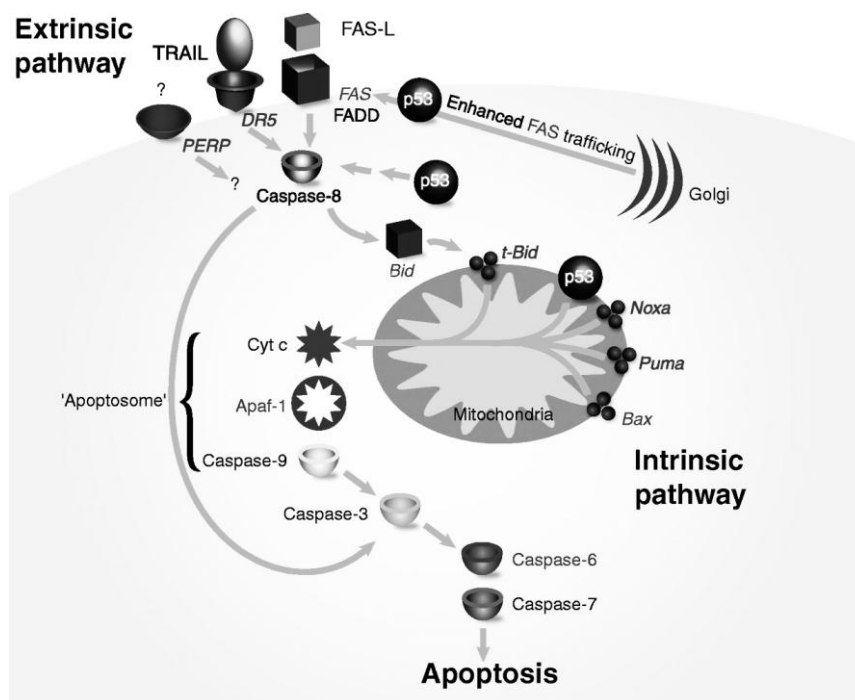


Abb. 6: Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der P53-vermittelten Apoptose. Der intrinsische Signalweg wird durch die P53-induzierte transkriptionelle Aktivierung der pro-apoptotischen Gene *BAX*, *PUMA* und *NOXA* eingeleitet, deren Proteine sich an die Mitochondrienmembran anlagern und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken. Cytochrom c bildet zusammen mit APAF-1 und der Caspase-9 das Apoptosome, wodurch letztlich die Caspasekaskade aktiviert und somit der Abbau zellulärer Bestandteile erwirkt wird. Der extrinsische Signalweg beruht auf der Bindung eines Liganden an einen oberflächenlokalisierten Todesrezeptor, wobei P53 für die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Todesrezeptoren verantwortlich ist. Beim extrinsischen Signalweg wird wiederum die Caspasekaskade ausgelöst und somit die Apoptose induziert (aus Haupt *et al.*, 2003).

1.8 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, zu untersuchen, ob dosis- und zeitabhängige Genexpressionsänderungen in humanen peripheren Blutlymphozyten prinzipiell für biodosimetrische Applikationen geeignet sind. Zunächst soll dazu das Vollblut von sechs gesunden Spendern mit 0,02, 0,1, 0,5, 1, 2 und 4 Gy γ -bestrahlt, die Lymphozyten aus dem bestrahlten Vollblut isoliert und aus diesen 6, 24 und 48 h nach Hochdosisbestrahlung (0,5 – 4 Gy) und 24 und 48 h nach Niedrigdosisbestrahlung (0,02 und 0,1 Gy) die RNA extrahiert werden. Die RNA soll anschließend für die Generierung von *Microarrays* verwendet werden. Die *Microarray*-Daten sollen nach sehr stringenter Korrektur der Alphafehlerkumulierung auf das Vorhandensein hoch-signifikanter Gensignaturen hin analysiert werden, die alleine oder in ihrer Gesamtheit erlauben, die Höhe einer vorangegangenen γ -Strahlenexposition korrekt zu ermitteln. Des Weiteren sollen strahleninduzierte Signalwege sowie physiologische Parameter bestrahlter Lymphozyten *in vitro* erfasst und beschrieben werden. Hierfür werden im Einzelnen folgende Untersuchungen *in vitro* durchgeführt:

- Bestimmung der Apoptoserate nach Hochdosisbestrahlung
- Auswertung der *Microarrays* zur Detektion signifikant veränderter Gene nach Hochdosisbestrahlung
- Signalweganalysen der signifikant veränderten Gene nach Hochdosisbestrahlung
- Identifizierung von Markergenen für Dosisabschätzungen nach Hochdosisbestrahlung
- Validierung der Expression ausgewählter Markergene nach Hochdosisbestrahlung
- Untersuchung der Korrelation zwischen Transkription und Translation an ausgewählten Markergenen nach Hochdosisbestrahlung
- Untersuchung der strahlenspezifischen Induktion der für die Dosiszuordnung nach Hochdosisbestrahlung identifizierten Markergene
- Bestimmung der Apoptoserate nach Niedrigdosisbestrahlung
- Identifizierung von Markergenen für Dosisabschätzungen nach Niedrigdosisbestrahlung
- Validierung der Expression ausgewählter Markergene nach Niedrigdosisbestrahlung.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
4-Acetamidophenol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Bio-SafeTM Coomassie</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
<i>Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Casy[®] Ton</i>	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP-Mix, jeweils 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Paschingen, Österreich
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrome, Berlin, Deutschland
<i>GeneRulerTM 100 bp DNA ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Immun-StarTM AP Substrate</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Lymphozytenseparationsmedium (LSM 1077)	PAA, Pasching, Österreich
Methanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nukleasefreies dH_2O	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Ponceau S solution</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>Quick Start Bradford 1 x Dye Reagent</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>RNase Zap</i>	<i>Applied Biosystems</i> , Austin, USA
<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)</i>	PAA, Pasching, Österreich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodiumorthovanadat ($\text{Na}_3\text{V}_4\text{O}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad, München, Deutschland
Tris-Base	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>TRIzol Reagent[®]</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween-20	Bio-Rad, München, Deutschland
Waschpuffer 1	<i>Agilent Technologies</i> Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Waschpuffer 2	<i>Agilent Technologies</i> Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
<i>Agilent Technologies Microarray Scanner G2505 B</i>	<i>Agilent Technologies</i> Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland

BD FACS CANTO™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Brutschrank MCO-20 AIC	Sanyo, Bad Nenndorf, Deutschland
Casy® Cell Counter	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad, München, Deutschland
¹³⁷ Cs-γ-Quelle	Gammacell 40, Atomic Energy Canada, Mississauga, Kanada
Gelkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Hybridisierungssofen	Sheldon Manufacturing, USA
Magnetrührer RCT basic IKAMAG®	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 UV-VIS Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
POWER PAC 3000	Bio-Rad, München, Deutschland
Professional basic Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallsonotrode	Hielscher, Teltow, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 1s-r	Heraeus, Deutschland

2.1.3 Software

Software	Hersteller
Agilent Scan Control Software	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery 6.7 (DAVID)	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
2100 Expert Software	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Feature Extraction 9.5.1 Software	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland

<i>GeneSpring GX 7.3.1</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
<i>Primerdesign</i>	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
<i>Quantity One</i> [®]	Bio-Rad, München, Deutschland
<i>Sequence Detection Software 1.3.1</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Kits

Kit	Hersteller
<i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I</i>	BD Pharmingen [™] , Heidelberg, Deutschland
<i>Gene Expression Hybridization Kit</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
<i>Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One Color</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
<i>Microarray Hybridization Chamber Kit</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
<i>One-Color RNA Spike-In Kit</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
<i>Power SYBR[®] Green RNA-to-C_T[™] 1-Step Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
<i>QIAquick[®] PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNA 6000 Nano Assay Kit</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
<i>RNeasy[®] Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
<i>Whole Human Genome Microarray Kit, 4 x 44K G4112F</i>	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland

2.1.5 Primer

Die synthetisierten *Primer* wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen und in dem vom Hersteller angegebenen Volumen nukleasefreiem dH₂O aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorlagen.

Tab. 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten *Primer*

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'	Produktlänge
<i>DOK7 up</i>	ACC ACC TGT TAA GCA TCA AGC TAC C	123 bp
<i>DOK7 dn</i>	CTG AGC TTC AGT TTC CTC CCA TAG A	
<i>FDXR up</i>	GCA AGG TTT TAG CTT TCA GCA ACT G	134 bp
<i>FDXR dn</i>	GTT TTA TTT CCA GCA TGT TCC CAA C	
<i>GAPDH up</i>	GAC CAC TTT GTC AAG CTC ATT TCC T	142 bp
<i>GAPDH dn</i>	TCT CTC TTC CTC TTG TGC TCT TGC T	
<i>HIST1H2AL up</i>	AAC AAG CTG CTG GGC AAA GTA AC	146 bp
<i>HIST1H2AL dn</i>	GAG CCG TTG TAT TGG AAA GTG ATT C	
<i>HIST1H4A up</i>	TCA AGG TGT TTT TGG AGA ACG TGA T	141 bp
<i>HIST1H4A dn</i>	AAC CTT AAC CGC CAA AGC CAT AAA G	
<i>LGR6 up</i>	TTA TGC CTA CCA GTG CTG TCC CTA T	150 bp
<i>LGR6 dn</i>	TCA TAG TGG TTC TCT GCT TGT CTG G	
<i>LY6G5C up</i>	CCA GGA CTT CTA GTC CCT CAT ACC A	122 bp
<i>LY6G5C dn</i>	GCT GGG GGT ACA GAG TAG CAG TAA G	
<i>PFKFB3 up</i>	TGC TGT TTT GTT TCG TTT CTG TGA T	141 bp
<i>PFKFB3 dn</i>	AAC AGT CAC GTG GAG GTT TTA CAC A	
<i>PHLDA3 up</i>	AGG CCC TTT CTT TGC ACA CTT CTT C	127 bp
<i>PHLDA3 dn</i>	TCA TTT GGG GAA AGA CAT GAA ATG C	
<i>SPATA18 up</i>	GTT CTG ATT TTG AGA GTG CCC AGT T	116 bp
<i>SPATA18 dn</i>	GCT GGC TTC TTA TCA AAT CAC TGC T	
<i>TNFSF4 up</i>	ATC TCA TCT CCC TGA AGG GCT ACT T	138 bp
<i>TNFSF4 dn</i>	CTT TGT AAG TCA GAG AGG CCA CCA T	
<i>VWCE up</i>	GTG TTT TCA CCT CCC AAT GAG AAC T	135 bp
<i>VWCE dn</i>	CAC TGG AAC ACA AGT ACA GCA ATC C	

2.1.6 Antikörper und Enzyme

Substanz

ADX Reduktase (H-300)

Bezugsquelle

Santa Cruz *Biotechnology*, Inc., Heidelberg,
Deutschland

<i>donkey anti-goat IgG-AP</i>	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , Inc., Heidelberg, Deutschland
GAPDH (FL-335)	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , Inc., Heidelberg, Deutschland
<i>goat anti-rabbit IgG-AP</i>	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , Inc., Heidelberg, Deutschland
OX40L (E-19)	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , Inc., Heidelberg, Deutschland
PHLDA3 (H-54)	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , Inc., Heidelberg, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
<i>Casy</i> [®] <i>Cups</i>	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
1,5 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>MicroAmp</i> [™] <i>Optical 96-Well reaction Plate</i>	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt, Deutschland
<i>Optical Adhesive Covers</i>	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt, Deutschland
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Roti [®] -PVDF	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
9 ml S-Monovette [®]	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Whatman paper</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Strahlen- und Chemikalienexposition

2.2.1.1 *Ex-vivo* γ -Bestrahlung von humanem Vollblut

Zu Beginn der Arbeit wurde ein Pool aus sechs gesunden Spendern zusammengestellt, die drei unterschiedlichen Altersklassen angehörten, wobei sich jede Altersklasse aus einem männlichen Spender und einer weiblichen Spenderin zusammensetzte (siehe Tab. 3). Von jedem der sechs Spender wurde in drei unabhängigen Versuchen an drei verschiedenen Tagen

durch Venenpunktion Vollblut in 9-ml Monovetten abgenommen. Anschließend wurden jeweils zwei mit Vollblut gefüllte Monovetten bei RT in einem ^{137}Cs -Bestrahlungsgerät mit 0,7 Gy/min mit 0,5, 1, 2 und 4 Gy γ -bestrahlt. Die Bestrahlungen mit 0,02 und 0,1 Gy erfolgten, indem eine 3,2 cm dicke Bleiabschirmung in das Bestrahlungsgerät eingelegt wurde, wodurch die Dosisrate auf 0,0286 Gy/min reduziert wurde. In jedem Versuch wurden von jedem Spender zwei unbestrahlte Monovetten als Kontrolle aufbewahrt.

Tab. 3: Alter und Geschlecht der initialen Blutspender

Spender	Alter	Geschlecht
1	25	weiblich
2	24	männlich
3	31	weiblich
4	33	männlich
5	48	weiblich
6	49	männlich

2.2.1.2 Mitomycin C- und 4-Acetamidophenol Inkubation

Von vier gesunden Spendern (Spender 1, 4, 5, 6; siehe Tab. 3) wurden durch Venenpunktion jeweils 45 ml Vollblut in fünf 9-ml Monovetten entnommen. Nach der Isolation der Lymphozyten (siehe 2.2.2.1) wurden diese für 6, 24 und 48 h mit 25 $\mu\text{g/ml}$ und 200 $\mu\text{g/ml}$ 4-Acetamidophenol respektive mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C inkubiert. Jeweils eine unbehandelte Lymphozytenkultur jedes Spenders wurde als Kontrolle verwendet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Lymphozytenisolation aus humanem Vollblut und Zellzahlbestimmung

Die Isolation der Lymphozyten aus dem Vollblut erfolgte durch Zentrifugation über einen Ficoll-Dichtegradienten (1,077 g/ml). Diese Methode basiert darauf, dass Lymphozyten eine geringere Dichte als das Isolationsmedium aufweisen und sich daher nach der Zentrifugation über dem Isolationsmedium anreichern. Die Erythrozyten und Granulozyten hingegen besitzen eine höhere Dichte und bilden in Folge dessen das Sediment (siehe Abb. 7).

Zur Isolation der Lymphozyten wurde das entnommene Blut (siehe 2.2.1.1; 2.2.1.2) in 50-ml Röhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen an vorgewärmtem RPMI 1640 versetzt und anschließend vorsichtig auf 15 ml des Lymphozytenisolutionsmediums geschichtet. Die einzelnen Blutbestandteile wurden durch eine 40-minütige Zentrifugation bei 400 x g und RT separiert, wonach sich das Blut-RPMI-Gemisch folgendermaßen auftrennte: Die oberste Schicht bildeten das Blutplasma und die Thrombozyten, gefolgt von einer dünnen weißen Schicht aus Lymphozyten. Die darunter befindliche Schicht wurde von Lymphozytenisolutionsmedium und das Sediment von Granulozyten und Erythrozyten gebildet. Die obere Plasmaschicht wurde mit einer Pasteurpipette bis etwa 3 mm über dem Lymphozytenring abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die Lymphozyten mit einer Pipette abgenommen, in ein neues 50-ml Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an RPMI 1640 aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 400 x g und RT, nach welcher der Überstand abgenommen und verworfen wurde. Das Pellet aus isolierten Lymphozyten wurde erneut mit 20 ml RPMI 1640 gewaschen und nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 400 x g und RT in 3 ml RPMI 1640 resuspendiert.

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung der isolierten Lymphozyten erfolgte mit dem *CASY[®] Counter*. Hierzu wurden 10 µl der in RPMI 1640 resuspendierten Lymphozyten mit 10 ml *CASY[®] Ton* in ein *CASY[®] Cup* gefüllt, in dem anschließend die Messung durchgeführt wurde. Die Zellzahlbestimmung erlaubt dabei die Diskriminierung von vitalen und nicht-vitalen Zellen, wobei für weitere Versuche nur die Anzahl der vitalen Zellen berücksichtigt wurde.

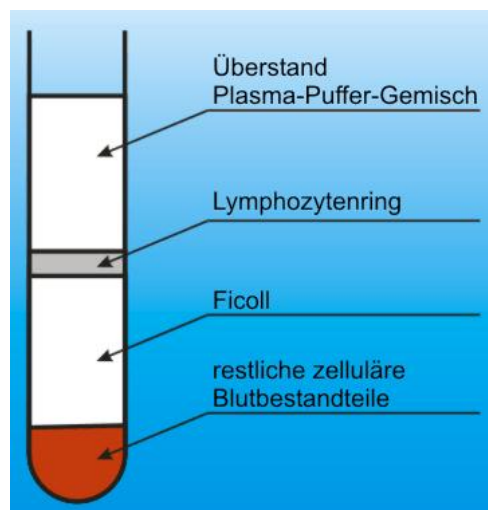


Abb. 7: Schematische Darstellung der aufgetrennten Blutkomponenten. Aufgrund der geringeren Dichte der Lymphozyten haben sich diese nach der Dichtegradientenzentrifugation zwischen Blutplasma und Ficollschicht gesammelt, wohingegen die Erythrozyten und Granulozyten sedimentiert sind (aus Gröger, 2007).

2.2.2.2 Kultivierung der Lymphozyten

Im Anschluss an die Isolation (siehe 2.2.2.1) wurden ca. 4×10^6 Lymphozyten pro Zellkulturflasche ausgesät. Die Lymphozyten wurden mit 1 ml FCS versetzt und die Zellkulturflasche mit RPMI 1640 auf 10 ml aufgefüllt. Die Kultivierung der Lymphozyten erfolgte bei 37 °C in gesättigter H₂O-Atmosphäre und 5% CO₂ in einem Inkubator.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Isolation der RNA aus Lymphozyten

Aus den mit 0, 0,5, 1, 2 und 4 Gy bestrahlten respektive mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C inkubierten Lymphozyten wurde 6, 24 und 48 h nach Behandlung die Gesamt-RNA isoliert, wohingegen aus den mit 0,02 und 0,1 Gy bestrahlten Lymphozyten die RNA jeweils 24 und 48 h nach Bestrahlung isoliert wurde. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte dabei mittels Trizol-Reagenz, welches eine monophasische Lösung, bestehend aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, darstellt. Zudem begünstigt Trizol den Zellaufschluss, löst Zellkomponenten auf und verhindert eine Degradierung der lymphozytären RNA.

Die in den Zellkulturflaschen befindlichen Lymphozyten wurden zunächst 5 min bei 400 x g und RT abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Trizol-Reagenz bei RT resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Lösung mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 sec lang energisch geschüttelt und wiederum für 10 min inkubiert. Dann erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 16.100 x g und RT, nach welchem sich die Lösung in drei Phasen teilte: eine untere rote Chloroformphase, eine weiße Interphase und eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde abgenommen und mit 800 µl 70%igem Ethanol versetzt. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *RNeasy Mini Kit*. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die RNA in 30 µl nukleasefreiem dH₂O eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden mittels eines *NanoDrop*[®]-Photometers gemessen. Hierbei musste der Quotient der Absorptionswerte bei 260/280 nm für die Proteinkontamination und bei 260/230 nm für die Kontamination mit organischen Lösungsmitteln einen Wert von $2,0 \pm 0,2$ aufweisen, damit die RNA für weitere Experimente verwendet wurde.

Die Integrität der RNA wurde mittels des *Bioanalyzer*s überprüft, in dem die RNA-Proben auf einen *RNA-6000-NanoChip* aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen wurden. Der

daraus gewonnene RIN-Wert (RNA-Integritätsnummer) basiert auf dem Verhältnis von 18S- zu 28S rRNA und kann Werte zwischen 1 und 10 annehmen, wobei 1 eine komplett degradierte RNA und 10 eine absolut intakte RNA darstellt. Für weitere Applikationen wurden nur RNA-Proben mit einem RIN-Wert über 8 verwendet. Das intakte RNA-Isolat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Poolen der isolierten Gesamt-RNA

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen bestrahlter Lymphozyten mittels *Microarrays* wurde die lymphozytäre Gesamt-RNA der sechs gesunden Spender (siehe 2.2.1.1; 2.2.3.1), die zum gleichen Zeitpunkt nach Bestrahlung isoliert und mit der gleichen Dosis bestrahlt sowie einem Versuchsdurchlauf angehörte, gepoolt. Da für die Vorbereitung der RNA-Proben für einen *Microarray-Chip* 400 ng Gesamt-RNA eingesetzt wurden, wurden von jedem der sechs Spender 66,67 µg Gesamt-RNA pro RNA-Probe gepoolt.

2.2.3.3 *Microarrays*

Die Genexpressionsanalyse humaner bestrahlter Lymphozyten erfolgte unter Verwendung von *whole human genome Microarrays* basierend auf dem *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol* (Agilent Technologies). Diese Methode ermöglicht es, unter Verwendung eines *Microarrays* die Expression aller Gene einer Probe zum gleichen Zeitpunkt zu messen. Die dazu verwendeten 4 x 44K *Microarrays* enthalten 60 Basen lange Oligonukleotide, welche spezifisch ein Gen des menschlichen Genoms kodieren. Die Methode basiert darauf, dass fluoreszenzmarkierte cRNA, die aus der RNA der zu untersuchenden Probe synthetisiert wird, an die auf dem *Microarray* befindliche komplementäre Sequenz eines Oligonukleotids bindet. Im Anschluss an die Hybridisierung werden die *Microarrays* gescannt und die an jedem Oligonukleotid befindliche Fluoreszenz detektiert. Je höher die gemessene Fluoreszenz ist, desto mehr markierte cRNA hat an das komplementäre Oligonukleotid hybridisiert und desto mehr Transkript des jeweiligen Gens war in der ursprünglichen Ausgangsprobe vorhanden (siehe Abb. 8).

Für die Untersuchungen im Hochdosisbereich wurden die gepoolten RNA-Proben von Lymphozyten (siehe 2.2.3.2), die mit 0, 0,5, 1, 2 und 4 Gy bestrahlt und 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung isoliert worden sind, verwendet. Insgesamt wurden drei unabhängige

Versuchsdurchläufe durchgeführt, so dass von jeder Probe drei biologische Replikate vorlagen, was bei drei Zeitpunkten und fünf Strahlendosen in einer Beladung von 45 *Microarrays* resultierte. In die Experimente im Niedrigdosisbereich wurden die gepoolten RNA-Proben der mit 0, 0,02 und 0,1 Gy bestrahlten Lymphozyten 24 und 48 h nach Bestrahlung eingesetzt, was bei drei unabhängigen Replikaten zu einer Beladung von 18 *Microarrays* führte.

Zu Beginn der *Microarray*-Experimente wurde der interne Standard, der *Spike-Mix*, vorbereitet, indem die Stammlösung 5 min bei 37 °C erhitzt und anschließend in drei Verdünnungsschritten 1:20, 1:25 und schließlich 1:10 verdünnt wurde, so dass eine 5000-fache Verdünnung der Stammlösung vorlag. Darauf folgend wurden pro Probe 400 ng gepoolte Gesamt-RNA (siehe 2.2.3.2) mit 4 µl des verdünnten *Spike-Mixes* und 1,2 µl T7 Promoter-*Primern* gemischt und mit nukleasefreiem dH₂O auf 11,5 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung erfolgte eine Inkubation der RNA-*Primer*-Lösung für 10 min bei 65 °C im *Thermocycler*. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden 8,5 µl cDNA-Mix zu dem RNA-*Primer*-Gemisch in jede Probe pipettiert, worauf wiederum eine Inkubation im *Thermocycler* für 2 h bei 40 °C, 15 min bei 65 °C und anschließend für 5 min bei 4 °C erfolgte, bei der die cDNA-Synthese durchgeführt wurde. Im Anschluss wurden 60 µl des Transkriptionsmixes zu jeder Probe gegeben, wonach sich eine weitere Inkubation im *Thermocycler* für 2 h bei 40 °C anschloss, während der die cRNA-Synthese und die Amplifikation von mit Cyanin 3-CTP markierter cRNA erfolgte. Die Cyanin 3 markierte cRNA wurde über eine Säule mittels des *RNeasy® Mini Kits* aufgereinigt und die Konzentration und die Markierungseffizienz der cRNA mittels des *NanoDrop®*-Photometers bestimmt. Nur Proben, deren RNA-Gehalt größer als 1,65 µg und deren spezifische Aktivität größer als 9,0 pmol Cyanin 3 pro µg cRNA waren, wurden in die anschließende Hybridisierung eingesetzt. Dazu wurden 1,65 µg RNA mit dem Fragmentierungsmix für 4 x 44K *Microarrays* gemischt und für exakt 30 min bei 60 °C im *Thermocycler* inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit 55 µl des GEx Hybridisierungspuffer luftblasenfrei gemischt und für 1 min bei 16.100 x g sowie bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl je Probe auf ein Feld eines Objektträgers aufgetragen, der insgesamt in vier Felder unterteilt und in eine Hybridisierungskammer eingespannt war. Nach Beladung aller vier Felder des Objektträgers mit je einer Probe wurde auf diesen ein Objektträger gelegt, auf dem sich vier *Microarrays* befanden. Die die *Microarrays* enthaltenden Hybridisierungskammern wurden zusammengebaut und für 17 h bei 65 °C in einem mit 10 rpm rotierenden Ofen fixiert, wobei die Hybridisierung der RNA an die komplementäre, auf dem *Microarray* befindliche,

Sequenz erfolgte. Nach 17 h wurde die Hybridisierungskammer wieder auseinandergebaut und die beiden Objektträger in einem mit Waschpuffer 1 gefüllten Gefäß auseinander gebrochen. Der Objektträger, auf dem sich die *Microarrays* befanden, wurde dann für 1 min in ein weiteres mit Waschpuffer 1 und dann für 1 min in ein mit Waschpuffer 2 gefülltes Gefäß überführt, der über Nacht auf 37 °C erwärmt wurde. Nachdem alle *Microarrays* gewaschen waren, wurden diese in das Scannerkarussell eingespannt und mit Hilfe der *Agilent Scan Control Software* gescannt. Die Aufbereitung der Daten erfolgte mit der *Feature Extraction Software* (siehe Abb. 8).

Eine Vorauswertung der *Microarray*-Daten erfolgte mittels der *GeneSpring GX Software*. Um jedoch Gene zu identifizieren, die für biosimetrische Applikationen verwendet werden können, wurden die *Microarray*-Daten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wolkenhauer von der Universität Rostock, genauer von Dipl.-Bioinf. Sonja Boldt, ausgewertet (siehe 2.2.6).

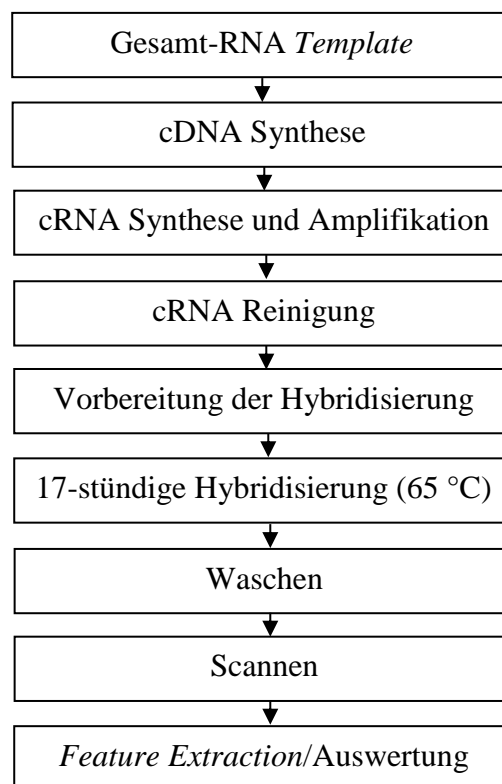


Abb. 8: Schematische Darstellung der *Microarray*-Präparation. Die Methode basiert darauf, dass fluoreszenzmarkierte cRNA an eine komplementäre Sequenz auf dem *Microarray* bindet, die spezifisch ein Gen des Genoms kodiert. Durch das Scannen der *Microarrays* wird die Fluoreszenz an den auf dem *Microarray* befindlichen Sequenzen detektiert, wobei die von dem spezifischen Transkript ausgehende Intensität der Fluoreszenz ein Maß für die Transkriptionsrate des jeweiligen Gens darstellt.

cDNA-Mix pro Ansatz (*Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One Color*)

4	µl	5 x <i>First Strand Buffer</i>
2	µl	0,1 M DTT
1	µl	10 mM dNTP Mix
1	µl	MMLV-RT
0,5	µl	<i>RNaseOut</i>

Transkriptionsmix pro Ansatz (*Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One Color*)

15,3	µl	nukleasefreies dH ₂ O
20	µl	4 x Transkriptionspuffer
6	µl	0,1 M DTT
8	µl	NTP Mix
6,4	µl	50% PEG
0,5	µl	<i>RNaseOut</i>
0,6	µl	Inorganische Pyrophosphatase
0,8	µl	T7 RNA Polymerase
2,4	µl	Cyanine 3-CTP

Fragmentierungsmix für 4 x 44K Microarrays (*Gene Expression Hybridization Kit*)

1,65	µg	Cyanine 3 markierte cRNA
11	µl	10 x <i>Blocking agent</i>
ad 52,8	µl	nukleasefreies dH ₂ O
2,2	µl	25 x Fragmentierungspuffer

Hybridisierungsprobe (*Gene Expression Hybridization Kit*)

55	µl	cRNA aus Fragmentierungsmix
55	µl	2 x GEx Hybridisierungspuffer HI-RPM

2.2.3.4 Quantitative *Real-time* PCR

Bei einer quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) wird zunächst die in der zu untersuchenden Probe enthaltene RNA in cDNA umgeschrieben, welche dann als *Template* in eine PCR (siehe 2.2.4.1) eingesetzt wird. Der Unterschied zu einer Standard-PCR besteht darin, dass während der Amplifikation *SYBR® Green* an die doppelsträngige DNA bindet, was nach jedem Zyklus als Fluoreszenz detektiert wird, wodurch eine Echtzeit-Quantifizierung der

amplifizierten DNA-Menge erfolgt. Insgesamt nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge des Amplifikats zu, wobei nur während der exponentiellen Phase der qRT-PCR eine korrekte Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgen kann, da nur während dieser Zeit optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden zunächst die gepoolten RNA-Proben (siehe 2.2.3.2; Tab. 3), die schon für die *Microarrays* verwendet wurden, in die qRT-PCR eingesetzt. In einem zweiten Schritt wurden nicht-gepoolte RNA-Proben von sechs Spendern verwendet (siehe Tab. 4), von denen drei Spender Teil des initialen Donorpools waren (siehe Tab. 3) und von drei weiteren Spendern, die dem initialen Donorpool nicht angehörten. Des Weiteren wurden RNA-Proben von vier Spendern nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation (siehe 2.2.1.2) für qRT-PCR-Messungen verwendet (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht über die Spender der nicht-gepoolten RNA-Proben

Spender	Alter	Geschlecht	Initialer Donorpool	Zusätzlicher Donorpool	4-Acetamidophenol & Mitomycin C
1	25	weiblich	x		x
4	33	männlich	x		
6	49	männlich	x		x
7	23	weiblich		x	
8	31	männlich		x	x
9	33	männlich		x	x

Zu Beginn der Messung wurde der qRT-PCR Mix mit den für die zu untersuchenden Gene spezifischen *Primern* (siehe 2.1.5) angesetzt. Die *Primer* wurden so konstruiert, dass das Produkt eine Länge zwischen 100 und 150 bp aufwies, die *Annealing*-Temperatur bei 59 °C und die Schmelztemperatur des Produktes zwischen 65 und 85 °C, idealerweise bei 75 °C, lag. Nach dem Vorlegen des *Master-Mixes* und der Zugabe von 30 ng RNA zu der jeweiligen Probe wurde die 96-well Platte für 1 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend in den qRT-PCR *Cycler* gestellt. Dabei wurden die in Tab. 5 beschriebenen PCR-Bedingungen verwendet, wobei die Amplifikation der cDNA unter Einbau von *SYBR® Green* direkt im Anschluss an die cDNA-Synthese erfolgte, da ein 1-Schritt-*Kit* verwendet wurde, welches die cDNA-Synthese und die darauf folgende Amplifikation während derselben Reaktion ermöglicht. Die Schritte 3, 4 und 5 wurden insgesamt 40-mal durchgeführt.

Tab. 5: QRT-PCR Bedingungen

Schritte	Temperatur/°C	Dauer/min
1. cDNA-Synthese	50	30
2. Vollständige Denaturierung	95	15
3. Denaturierung	94	0,25
4. Hybridisierung	59	0,5
5. Elongation	72	0,67

Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet, wobei die Expression dieses Gens für jede Probe gemessen wurde. Nach Beendigung der qRT-PCR wurde die Spezifität des Produktes durch eine Schmelzkurvenanalyse bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mittels der *Sequence Detection Software 1.3.1*, bei welcher das detektierte Signal durch den Referenzfarbstoff ROX korrigiert und die relative Expression der gemessenen Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben wurde. Dies wurde wie folgt berechnet:

1. Normalisierung des Zielgens zur endogenen Kontrolle (*GAPDH*):

$$\text{Ct Zielgen} - \text{Ct endogene Kontrolle (GAPDH)} = \Delta\text{Ct Probe/ Kalibrator}$$
2. Normalisierung zur Kalibratorprobe, also zur unbehandelten Kontrolle:

$$\Delta\text{Ct Probe (behandelte Proben)} - \Delta\text{Ct Kalibrator (Kontrolle)} = \Delta\Delta\text{Ct}$$
3. Einsetzen in folgende Formel:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Die weitere Analyse der durch qRT-PCR-Messungen generierten Expressionsdaten erfolgte mittels Microsoft Excel. Dabei wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate und unter Zuhilfenahme des *Student's t-Test* signifikante Expressionsänderungen zwischen verschiedenen Proben bestimmt.

Zur Überprüfung der Spezifität der *Primer* wurden die qRT-PCR-Produkte nach Herstellerangaben unter Verwendung des *QIAquick® PCR Purification Kits* aufgereinigt. Im Anschluss wurden die aufgereinigten qRT-PCR Proben zur Kontrolle der Amplifikation auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen (siehe 2.2.4.2). Des Weiteren wurden die Amplifikate kommerziell durch die *Sequiserve GmbH* (Vaterstetten, Deutschland) sequenziert.

Reaktionskomponenten eines Ansatzes einer qRT-PCR (Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit)

200	nM	<i>Primer up</i>
200	nM	<i>Primer dn</i>
0,16	µl	Reverse Transkription Enzym Mix (125 x)
10	µl	Reverse Transkription PCR Mix (2 x)
30	ng	RNA-Template
ad 20	µl	nukleasefreies dH ₂ O

2.2.3.5 Herstellung der cDNA

Die Spezifität der *Primer* (siehe 2.1.5), die in die qRT-PCR (siehe 2.2.3.4) eingesetzt wurden, wurde vorab getestet, indem Gesamt-RNA mittels des *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben wurde. Zunächst wurde dabei der *Template-Primer-Mix* im *Thermocycler* für 10 min bei 65 °C erhitzt und im Anschluss direkt auf Eis gekühlt, wodurch die Ausbildung von Sekundärstrukturen der als *Template* eingesetzten RNA verhindert wurde. Anschließend wurde der Reverse Transkriptionsmix zu der Probe pipettiert und diese zur cDNA-Synthese für 30 min bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die Probe für 5 min bei 85 °C im *Thermocycler* erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Template-Primer-Mix pro Ansatz (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit)

1	pmol	Oligo(dT) ₁₈ <i>Primer</i>
50	ng	Gesamt-RNA
ad 11,4	µl	nukleasefreies dH ₂ O

Reverser Transkriptionsmix pro Ansatz (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit)

4	µl	Reverse Transkriptase Reaktionspuffer
0,5	µl	RNase Inhibitor
2	µl	Desoxynukleotidmix
1	µl	DTT
1,1	µl	Reverse Transkriptase

2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.4.1 Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988)

Im Anschluss an die cDNA-Synthese (siehe 2.2.3.5) wurde die cDNA als *Template* in eine Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, um die Spezifität der für die qRT-PCR benötigten *Primer* (siehe 2.1.5) zu testen. Bei einer PCR werden bestimmte DNA-Bereiche *in vitro* aus einem Gemisch von DNA-Molekülen selektiv angereichert. Benötigt werden dazu eine thermostabile DNA-Polymerase, die Ausgangs-DNA als *Template*, zwei *Primer*, die komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind, sowie DNA-Polymerasepuffer und ein dNTP-Mix. Das Prinzip der PCR beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten:

1. Denaturierung des *Templates*
2. Hybridisierung der *Primer* an die komplementäre Sequenz des *Templates*
3. Verlängerung der angelagerten *Primer* durch die DNA-Polymerase, wodurch das *Template* kopiert wird.

Für die PCR wurden die Reaktionskomponenten gemischt und anschließend für die Amplifikation im *Thermocycler* dem in Tab. 6 dargestellten PCR-Programm unterzogen, wobei die Schritte 2, 3 und 4 insgesamt 40-mal durchgeführt wurden. Die amplifizierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 6: Standard-PCR Bedingungen

Schritte	Temperatur/°C	Dauer/min
1. Vollständige Denaturierung	95	3
2. Denaturierung	95	0,5
3. Hybridisierung	59	0,5
4. Elongation	72	0,5
5. finale Elongation	72	5

Reaktionskomponenten einer Standard-PCR

5-10	pmol	<i>Primer up</i>
5-10	pmol	<i>Primer dn</i>
1	x	Polymerase-Puffer
0,2	mM	dNTP-Mix
1,25	U	DNA-Polymerase
1	mM	25 mM MgCl ₂
50	ng	DNA- <i>Template</i>
ad 50	µl	dH ₂ O

2.2.4.2 Agarosegelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Überprüfung der Spezifität der *Primer* (siehe 2.1.5) und der Amplifikation während der qRT-PCR (siehe 2.2.3.4) wurden die Produkte auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen und einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Diese Methode ist ein Trennverfahren basierend auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle in einer Gelmatrix im elektrischen Feld. Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis besitzen, wandern durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht und ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Für die Gelmatrix wurde aufgrund der geringen Größe der zu überprüfenden DNA-Fragmente eine Agarosekonzentration von 1,5% (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Zur Anfärbung der DNA im Gel wurde dieses nach Beendigung der Agarosegelelektrophorese mit 0,5% Ethidiumbromidstandardlösung inkubiert und im Anschluss 10 min mit dH₂O entfärbt. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA erfolgte nach der Elektrophorese durch Bestrahlung mit UV-Licht in einer Geldokumentationsanlage.

TBE-Puffer (pH 8,3)

89	mM	Tris-Base
89	mM	Borsäure
2,5	mM	EDTA

DNA-Probenpuffer (5 x)

100	mM	EDTA
33	%	Glycerol
0,05	%	BPB (w/v)

Ethidiumbromid-Färbelösung

0,5	%	EtBr (w/v)
-----	---	------------

2.2.5 Proteinchemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Aus kultivierten Lymphozyten (siehe 2.2.2.2) wurden 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung Proteine isoliert. Dazu wurden zunächst ca. 4×10^6 in Kultur befindliche Lymphozyten in ein 15-ml Röhrchen gefüllt und bei 4 °C für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation bei 4 °C für 5 min bei 400 x g folgte. Anschließend wurde das Lymphozyten enthaltende Pellet in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und mittels einer Ultraschallsonotrode für 3 min bei 70% *Power* und 0,5 Puls der Zellaufschluss auf Eis durchgeführt. Danach wurde die Suspension in ein 1,5-ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 16.100 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der das Proteinlysate enthaltende Überstand abgenommen und in ein weiteres 1,5-ml Eppendorfgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Proteinlysate bei -80 °C gelagert.

Lysispuffer (pH 7,5)

0,025	M	Tris-HCl
0,15	M	NaCl
0,001	M	EDTA
0,001	M	EGTA
0,001	M	Na ₃ V ₄ O
0,001	M	NaF
1	%	Triton-X-100
0,001	M	PMSF
1	µg/ml	Proteaseinhibitor- <i>Cocktail</i>

2.2.5.2 Translationshemmung

Von drei gesunden Spendern (Spender 1, 6, 9; siehe Tab. 4) wurden durch Venenpunktion jeweils 54 ml Vollblut in sechs 9-ml Monovetten entnommen. Im Anschluss wurden jeweils zwei 9-ml Monovetten mit 1 und 4 Gy bestrahlt und zwei weitere 9-ml Monovetten als Kontrolle (0 Gy) verwendet. Nach der Isolation der Lymphozyten (siehe 2.2.2.1) wurden diese mit 50 µg/ml Cycloheximid inkubiert (siehe 2.2.2.2) und aus diesen 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung Zelllysate isoliert (siehe 2.2.5.1).

2.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten (siehe 2.2.5.1) erfolgte mittels der Bradford-Methode, die auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 an Proteine basiert. Durch die Komplexbildung des Farbstoffes mit Proteinen verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 470 auf 595 nm, wobei die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung darstellt.

Dazu wurden 10 µl der in Lysispuffer resuspendierten Probe mit 10 µl dH₂O und 980 µl Bradford-Reagenz vermischt, 5 min bei RT inkubiert und die O.D._{595nm} spektralphotometrisch gegen die Referenzlösung ermittelt, indem 2 µl der Probe auf den *NanoDrop*[®] pipettiert wurden. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit BSA-Standardlösungen von 25, 50, 100 und 150 µg/ml vor jeder Messreihe neu erstellt wurde.

Referenzlösung

980	µl	Bradford-Reagenz
10	µl	dH ₂ O
10	µl	Lysispuffer

2.2.5.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Nach der Herstellung von Zelllysaten (siehe 2.2.5.1) und der Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.2.5.3) wurde die gewünschte Proteinkonzentration eingesetzt und die Probe mit einem adäquaten Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurde das Lysat-Probenpuffer-Gemisch für 10 min bei 99 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in einem diskontinuierlichen Gelsystem, bestehend aus Sammel- und Trenngel. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. So wurden die Proteine während der Elektrophorese aufgrund ihres ähnlichen Masse-/Ladungsverhältnisses nach ihrer Molekülgröße getrennt. Es wurden pro Probe zwischen 5 µg und 10 µg Zelllysate eingesetzt, wobei die darin enthaltenen Proteine in einem Sammelgel fokussiert und anschließend in einem Trenngel ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt wurden. Die Elektrophorese wurde für 20 min bei 100 V und anschließend für 1 h bei 200 V durchgeführt.

Tab. 7: Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamidgelen (die Mengenangaben gelten für zwei Gele)

Lösungen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamidstammlösung	0,83 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	---	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	---
dH ₂ O	2,77 ml	3,35 ml
10 % SDS (w/v)	50 µl	100 µl
10 % APS (w/v)	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

SDS-Probenpuffer

50	mM	Tris-HCl (pH 6,8)
10	%	Glycerol (v/v)
4	%	SDS (v/v)
2	%	β -Mercaptoethanol (v/v)
0,03	%	BPB (w/v)

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8)

25	mM	Tris-HCl
192	mM	Glycin
0,1	%	SDS (w/v)

Acrylamid-Stammlösung

29,2	g	Acrylamid
0,8	g	N,N'-Methylenbisacrylamid
ad 100	ml	dH ₂ O

2.2.5.5 Coomassie Brilliant-Blau-Färbung einer SDS-PAGE (Merril, 1990)

Die Färbung einer SDS-PAGE (siehe 2.2.5.4) in Coomassie Brilliant-Blau-Färbelösung erfolgte nach der Elektrophorese bei RT. Nach 30 min Inkubation wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt, welche alle 20 min bis zur optimalen Bandendarstellung gewechselt wurde. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels des ChemiDocTM XRS+.

Alternativ wurden die Gele mit *Bio-SafeTM Coomassie* nach Herstellerangaben gefärbt und durch mehrmaliges Waschen mit dH₂O bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes entfärbt.

Färbelösung

10	%	Essigsäure (v/v)
25	%	Methanol (v/v)
0,2	%	Coomassie Brilliant Blau R250

Entfärbelösung

7	%	Essigsäure (v/v)
5	%	Methanol (v/v)

2.2.5.6 Proteintransfer auf PVDF-Membran (Yuen et al., 1989)

Die mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.5.4) aufgetrennten Proteine wurden durch die *Mini PROTEAN[®] Tetra Cell*-Apparatur auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran für 2 min in Methanol und dann für 5 min in dH₂O äquilibriert und *Whatman paper* und Blotschwämme in Dunn-Carbonat-Puffer getränkt. Danach erfolgte der Aufbau der Blotkammer, indem auf einen Schwamm zwei *Whatman paper*, darauf die SDS-PAGE, auf diese die Membran gefolgt von zwei weiteren *Whatman papern* und einem Schwamm gelegt wurden. Der Transfer der Proteine erfolgte anschließend in Dunn-Carbonat-Puffer für 15 min bei 150 mA und für weitere 32 min bei 300 mA.

Dunn-Carbonat-Puffer (Dunn, 1986)

10	mM	NaHCO ₃
3	mM	Na ₂ CO ₃
20	%	Methanol (v/v)

2.2.5.7 Ponceau-S-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine von der SDS-PAGE (siehe 2.2.5.4) auf die PVDF-Membran (siehe 2.2.5.6) wurde diese mit *Ponceau S* gefärbt, um die Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Dazu wurde die Membran zunächst 10 min mit *Ponceau-S*-Lösung inkubiert und im Anschluss solange mit dH₂O gewaschen, bis distinkte Banden sichtbar waren. Vor der Antikörpermarkierung wurde die Membran weiter mit dH₂O entfärbt bis keine Färbung mehr sichtbar war.

2.2.5.8 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (siehe 2.2.5.6) wurde diese entweder 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in TBST-Puffer mit 5% Milchpulver (w/v) geblockt. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zunächst wurden die PVDF-Membranen dreimal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Primärantikörper (siehe 2.1.6) in einer Konzentration von 1:200 inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener AK wurden die Membranen danach dreimal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die

Membranen mit dem Sekundärantikörper-Enzym-Konjugat in einer Konzentration von 1:3000 für 1 h inkubiert und dann nochmals dreimal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Das auf der Membran gebundene Protein konnte dann indirekt über die an den Sekundärantikörper gebundene Alkalische Phosphatase mit Hilfe des *Immun-StarTM AP* Substrates nachgewiesen werden, welches gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Die Dokumentation erfolgte je nach Signalstärke für 16-30 min in einer Geldokumentationsanlage.

Als interne Kontrolle wurde GAPDH bei jeder Immunodetektion mitgeführt und für die nachfolgende Proteinnormierung verwendet.

Die semi-quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte zunächst mittels der *Sequence Detection Software 1.3.1*, durch welche die Pixelintensitäten der Banden der zu untersuchenden Probe und der zugehörigen internen Kontrolle bestimmt wurde. Die weitere Auswertung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Dabei erfolgte im ersten Schritt eine Normalisierung der zu untersuchenden Probe, indem der Quotient aus der Pixelintensität der Probe und der internen Kontrolle gebildet wurde. Anschließend erfolgte die Berechnung der relativen Expression, indem der Quotient der normalisierten Expression der zu untersuchenden Probe und der normalisierten Expression der unbehandelten Kontrolle gebildet wurde.

TBS-Puffer

25	mM	Tris-HCl (pH 8)
150	mM	NaCl
3	mM	KCl

TBST-Puffer

0,2	%	Tween [®] 20 (v/v) in TBS-Puffer
-----	---	---

2.2.5.9 Durchflusszytometrische Apoptosemessung

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine semi-quantitative Messung von Zellparametern mit hoher Präzision und großem Durchsatz. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen durch eine Kapillare gesaugt, hydrodynamisch fokussiert und anschließend in der Durchflusszelle mit Laserlicht angeregt, wobei die Lichtstreuung und das emittierte Fluoreszenzlicht frequenzspezifisch detektiert werden. Die Reflexion des Lichtes gibt dabei Auskunft über die Größe (*Forward Scatter*) und die Granularität (*Side Scatter*) einer Zelle. Mittels der Fluoreszenzmessung erfolgt eine Quantifizierung, beispielsweise von Proteinen oder anderen

Zellkomponenten, indem Fluorophore direkt oder durch Kopplung an spezifische Antikörper an diese binden.

Die Apoptoserate der mit unterschiedlichen Strahlendosen bestrahlten und mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C inkubierten Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung des Annexin V-FITC/ Propidiumiodid-Assays in nicht-fixierten Zellen bestimmt. Die Methode beruht darauf, dass das Phosphatidylserin, das sich bei nicht-apoptotischen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet, während der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran transloziert wird. Das mit FITC markierte Annexin V bindet hochspezifisch an das Phosphatidylserin und kann durchflusszytometrisch gemessen werden, wobei das Absorptionsmaximum von FITC bei 494 nm und das Emissionsmaximum bei 525 nm liegt (grünes Licht). Da das Annexin V-FITC in spät-apoptotische/ nekrotische Zellen aufgrund der zunehmenden Permeabilität der Zellmembran in die Zelle eindringen kann, werden die Lymphozyten zur Unterscheidung der verschiedenen Apoptosephasen zusätzlich mit dem DNA-affinen Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid gefärbt. Propidiumiodid kann dabei nur in Zellen mit stark durchlässiger Zellmembran, also in spät-apoptotische/ nekrotische Zellen, eindringen und interkaliert dann in die DNA. Propidiumiodid besitzt nach Interkalation in die DNA ein Absortionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm, wodurch es als Signal im roten Spektralbereich distinkt von dem durch FITC erzeugten grün-leuchtenden Signal zu unterscheiden ist. Vitale Zellen sind daher Annexin-FITC- und Propidiumiodid-negativ (siehe Abb. 9 A), früh-apoptotische Zellen Annexin-FITC-positiv und Propidiumiodid-negativ und spät-apoptotische/ nekrotische Zellen Annexin-FITC- und Propidiumiodid-positiv (siehe Abb. 9 B). Anhand von Negativ- und Positivkontrollen wurden die entsprechenden Auswertequadranten (Q1 bis Q4) festgelegt (siehe Abb. 9).

Für die Apoptosemessung wurden ca. 10^5 Lymphozyten zunächst für 5 min bei 400 x g und RT abzentrifugiert und danach zweimal mit kaltem PBS gewaschen, wobei auf jeden Waschschrift eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C folgte. Nach Abnahme des Überstandes wurde im letzten Schritt das Lymphozytenpellet in 100 µl Bindungspuffer resuspendiert und mit jeweils 5 µl Annexin V-FITC und Propidiumiodid für 15 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 200 µl Bindungspuffer erfolgte die durchflusszytometrische Messung im BD FACS CANTO™ II.

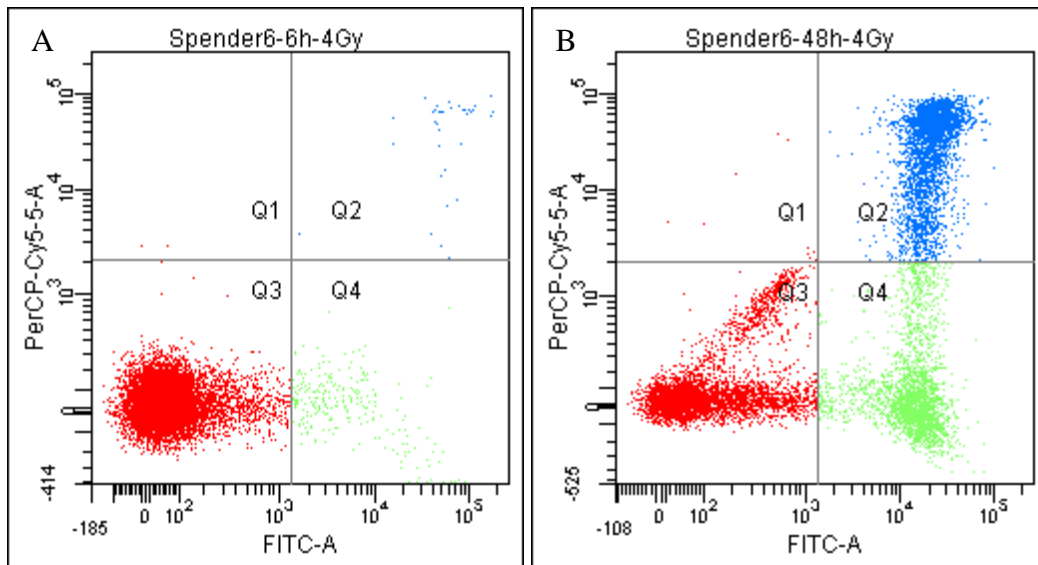


Abb. 9: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Messung von mit Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-markierten Lymphozyten. Q1: Propidiumiodid-positive Zellen, Q2: Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-positive Zellen (spät-apoptotisch/ nekrotisch), Q3: ungefärbte Zellen (vital), Q4: Annexin V-FITC-positive Zellen (früh-apoptotisch). A: 6 h nach Bestrahlung mit 4 Gy sind fast alle Zellen vital (Q3). B: 48 h nach Bestrahlung mit 4 Gy liegen viele apoptotische Zellen vor (Q2, Q4).

2.2.6 Microarray-Analyse

2.2.6.1 Filtern der Microarray-Daten

Die zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung (6, 24, 48 h) mit fünf verschiedenen Dosen (0, 0,5, 1, 2, 4 Gy) generierten *Microarray*-Daten (siehe 2.2.3.3) wurden zunächst zu einem Datensatz zusammengefasst. Aus diesem Datensatz wurden anschließend uneinheitliche Ausreißer und Signale entfernt, welche in 25% der Proben keine Intensität aufwiesen, die höher als die Hintergrundintensität war. Die verbliebenen normalisierten Signale wurden für weitere Analysen verwendet.

Die *Microarray*-Daten, basierend auf Proben, die mit 0, 0,02 und 0,1 Gy bestrahlt und 24 und 48 h nach Bestrahlung isoliert worden sind (siehe 2.2.3.3), wurden zunächst auch zu einem Datensatz zusammengefasst. Aus diesem wurden anschließend uneinheitliche Ausreißer und Signale entfernt, die in 25% der Proben keine Intensität aufwiesen, die höher als die Hintergrundintensität war.

2.2.6.2 Statistische Analyse der *Microarray*-Proben

Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), eine Verallgemeinerung des ungepaarten t-Tests die es ermöglicht, die Mittelwerte von drei oder mehr unabhängigen Gruppen zu vergleichen, wurde angewandt, um nach Bestrahlung im Hochdosisbereich (0,5 – 4 Gy) signifikant veränderte Genexpressionen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 Gy) zu identifizieren. Um für multiples Testen zu korrigieren, wurde die Methode von Benjamini und Hochberg zur Kontrolle der *False Discovery Rate* (FDR) verwendet. Gene mit einem adjustierten p-Wert $< 0,01$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

Zur Identifizierung von signifikant veränderten Genen im Niedrigdosisbereich (0,02 und 0,1 Gy) wurde ebenfalls die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Der Unterschied zum Hochdosisbereich bestand jedoch darin, dass im Niedrigdosisbereich Gene als signifikant erachtet wurden, die einen korrigierten p-Wert $< 0,05$ aufwiesen.

Nach der Korrektur des p-Wertes erfolgte sowohl für den Hoch- als auch für den Niedrigdosisbereich die Anwendung des *Tukey's honestly significant difference test*. Dieser *Post-Hoc-test* ermöglicht einen paarweisen Vergleich der Gruppenmittelwerte.

2.2.6.3 Funktionale Analyse signifikant veränderter Gene

Für die funktionale Analyse wurden die zu einem Zeitpunkt nach Bestrahlung mit einer Dosis signifikant veränderten Gene in Genlisten zusammengefasst und mittels der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery 6.7* (DAVID; Huang da et al., 2009) analysiert. Dabei wurde die Zuordnung der signifikant veränderten Gene zu den verschiedenen Signalwegen über die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; Kanehisa & Goto, 2000) vorgenommen.

2.2.6.4 Retrospektive Zuordnung von Strahlendosen

Für die Auswahl von Genen, die als Biomarker für eine Zuordnung der Strahlendosis einer vorangegangenen Bestrahlung im Hochdosisbereich geeignet sind, wurden die generierten *Microarrays* (siehe 2.2.3.3) unter Verwendung einer 9-fachen Kreuzvalidierung ausgewertet (siehe Abb. 10). Dazu wurde der aus 45 *Microarrays* bestehende Datensatz, zusammengesetzt aus drei biologischen Replikaten für jede Dosis (0, 0,5, 1, 2, 4 Gy) und jeden Zeitpunkt (6, 24, 48 h), nach dem Zufallsprinzip in neun Sets geteilt. Jedes dieser Sets bestand dabei aus den

Daten von fünf *Microarrays*, je einem *Microarray* für jede untersuchte Strahlendosis (0, 0,5, 1, 2, 4 Gy). Acht der Sets („Trainingssets“), insgesamt 40 *Microarrays*, wurden verwendet, um potenzielle Biomarker für eine korrekte Dosiszuordnung zu identifizieren. Das nicht mit in die Analyse einbezogene Set („Testset“) wurde exklusiv dazu verwendet, die Genauigkeit der Dosiszuordnung anhand der aus den Trainingssets identifizierten Biomarker zu bestimmen. Dieser Auswertevorgang wurde neunmal wiederholt, so dass jeder Datensatz achtmal bei der Identifizierung von Dosisindikatoren und je einmal als Testset genutzt wurde. Das stochastische Arrangieren der neun Sets wurde 100-Mal wiederholt, so dass insgesamt 900 Trainingssets für die Auswahl geeigneter Biomarker und 900 Testsets für die Validierung der zur Dosisabschätzung identifizierten Gene zur Verfügung standen, was einer 9-fachen Kreuzvalidierung entspricht.

Die Auswahl geeigneter Gene für eine Dosisabschätzung erfolgte unter Verwendung von zwei Methoden: In einem ersten Schritt wurde eine einseitige ANOVA-Analyse angewandt, um eine auf dem p-Wert basierende Auswahl der Biomarker vorzunehmen, was bedeutet, dass Gene mit einem p-Wert $< 0,05$ nach Bonferroni-Korrektur als signifikant strahleninduziert behandelt wurden. Nachdem die auf dem p-Wert basierende Selektionsmethode auf jedes der 900 Trainingssets angewandt worden ist, wurden 900 unabhängige Genlisten generiert, die sich dabei aus unterschiedlichen Genen zusammensetzten. Um eine Reduktion der Genlisten zu erreichen, wurde nachfolgend eine auf dem höchsten Expressionsunterschied (*highest fold-change*) basierende Methode angewandt. Dabei wurden die 10 Gene aus jeder der 900 Genlisten ausgewählt, die die größten Expressionsunterschiede nach Bestrahlung aufwiesen. Hierüber wurden 900 neue Genlisten generiert, von denen jede einzelne die 10 Gene mit dem größten Expressionsunterschied nach Bestrahlung enthielt.

Die Dosiszuordnung wurde anhand einer *k-Nearest-Neighbour* Klassifikation vorgenommen, bei welcher die Strahlendosis der in den Testsets befindlichen Proben bestimmt wurde. Dabei legt die Ähnlichkeit der Expressionsmuster der Proben des Testsets zu den k nächsten Expressionsmustern der Proben des Trainingssets die Klassenzugehörigkeit fest, indem ein Mehrheitskriterium angewendet wird. Die Ähnlichkeit wird über die euklidische Distanz der jeweiligen Expressionsmuster zueinander bestimmt. Dazu wurden die *Microarrays* der Testsets der Strahlendosis in den Trainingssets zugeordnet, die die größte Übereinstimmung zu diesen aufwies.

Zwei häufig verwendete Maße zur Beurteilung einer korrekten Zuordnung sind die Sensitivität und die Spezifität, die zunächst für jede gemessene Strahlendosis einzeln ermittelt wurden. Hierbei beschreibt die Sensitivität den Anteil der Proben einer Strahlendosis, die

durch den Klassifikationsprozess korrekt zugeordnet wurden, gemessen an der Gesamtheit aller Proben einer Strahlendosis. Die Spezifität berechnet den Anteil der Proben, die korrekterweise nicht der betrachteten Strahlendosis zugeordnet wurden, gemessen an der Gesamtheit der Proben, die dieser Strahlendosis nicht angehören. Die Güte der Dosiszuordnung ergibt sich dann aus dem Mittel aller Sensitivitäten bzw. Spezifitäten.

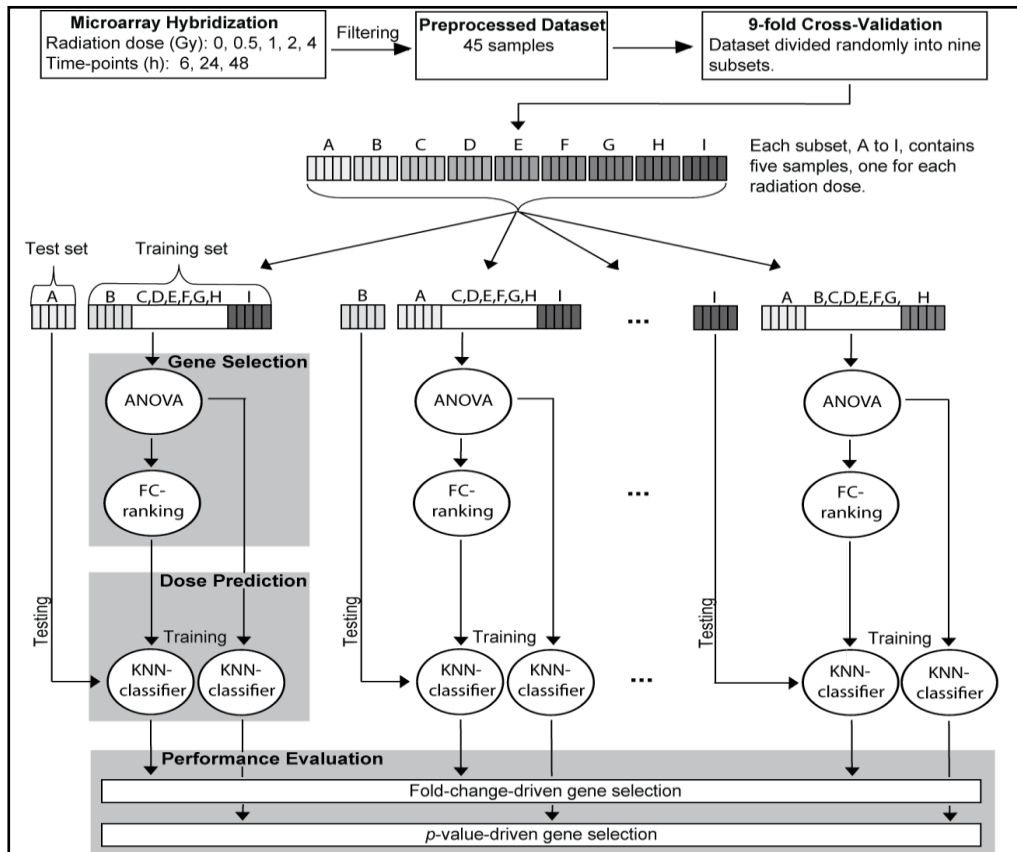


Abb. 10: Schematische Darstellung der Auswertung zur Identifizierung von Dosisindikatorgenen nach Bestrahlung. Dabei wurden die vorprozessierten Daten zufällig in neun Sets unterteilt, wobei in jedem Set jede Strahlendosis (0, 0,5, 1, 2, 4 Gy) einmal repräsentiert wird. Acht der Sets wurden dann als Trainingssets für die Identifizierung geeigneter Gene für eine korrekte Dosiszuordnung genutzt, während ein Set als Testset zur Überprüfung der Anwendbarkeit der identifizierten Indikatorgene für die Dosisabschätzung verwendet wurde. Ausgewählt wurden die Indikatorgene durch eine Kombination von zwei Methoden basierend auf dem p-Wert und dem höchstem Expressionsunterschied. Die Dosiszuordnung, beruhend auf den identifizierten Indikatorgenen, erfolgte mittels einer *k-Nearest Neighbour* Klassifikation (aus Boldt *et al*, 2012).

Die Auswahl der Indikatorgene im Niedrigdosisbereich erfolgte, wie zuvor für den Hochdosisbereich beschrieben, wobei im Vergleich zu der 9-fachen eine 6-fache Kreuzvalidierung aufgrund der geringeren *Microarray*-Anzahl verwendet wurde. Dazu wurde das aus 18 *Microarrays* bestehende Datenset, basierend auf mit 0, 0,02 und 0,1 Gy bestrahlten und 24 und 48 h nach Bestrahlung isolierten Proben, analog nach dem Zufallsprinzip in sechs Trainings- und sechs Testsets aufgeteilt. Jedes Set bestand dabei aus drei *Microarrays*, je einem *Microarray* für jede untersuchte Strahlendosis (0, 0,02, 0,1 Gy). Die 6-fache Kreuzvalidierung wurde 100-Mal wiederholt, so dass letztlich 600 Trainingssets für die

Genselektion und 600 einzelne Testsets für die Evaluierung der Dosiszuordnung generiert und analysiert wurden. Auf jedes der 600 Trainingssets wurde ANOVA angewandt, wodurch nach Fallzahlkorrektur unter Verwendung der Benjamini- und Hochberg-Methode 600 neue Genlisten, bestehend aus Genen mit einem p-Wert $< 0,05$, identifiziert wurden. In einem zweiten Schritt wurden aus jeder dieser 600 Genlisten die 20 Gene mit dem höchsten Expressionsunterschied (*highest fold-change*) zwischen 0,02 und 0,1 Gy selektiert, wobei wiederum 600 neue Genlisten generiert wurden. Anschließend wurden aus diesen neuen Genlisten die Gene ausgewählt, die mindestens in 500 der 600 Genlisten enthalten waren. Diese Gene bildeten die Kernsignatur, unter deren Verwendung mittels der *k-Nearest-Neighbour* Klassifikation die Sensitivität und die Spezifität der Dosisabschätzung im Niedrigdosisbereich bestimmt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der biologischen Wirkung von Hochdosisbestrahlung auf Lymphozyten

Unter Verwendung von *Microarrays* wurden in humanen peripheren Lymphozyten Genexpressionsanalysen nach Hochdosisbestrahlung durchgeführt. Die mittels der *Microarrays* generierten Expressionsdaten wurden zunächst dahingehend ausgewertet, alle signifikant veränderten Gene nach Bestrahlung zu identifizieren und diese den jeweiligen bekannten Signalwegen zuzuordnen, um dosis- und zeitabhängige Änderungen in den aktivierten Signalwegen zu analysieren. Das Hauptziel der auf den *Microarrays* basierenden Genexpressionsanalyse bestand jedoch darin, Gene zu identifizieren, die nach Bestrahlung hochsignifikante dosisabhängige Expressionsänderungen aufwiesen und dadurch gegebenenfalls für biodosimetrische Applikationen nach Hochdosisbestrahlung geeignet sind. Zudem wurde untersucht, ob sich die detektierten Änderungen der Genexpressionen von ausgewählten Genen auch auf Proteinebene widerspiegelten.

3.1.1 Bestimmung der Apoptoserate von Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung

Die Apoptoserate von Lymphozyten von sechs gesunden Spendern nach Bestrahlung (siehe 2.2.1.1) wurde mittels des Annexin V-FITC Propidiumiodid-Assays durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 2.2.5.9).

Der Anteil an vitalen Lymphozyten erniedrigte sich mit zunehmender Zeit nach Kultivierungsbeginn sowohl in den unbestrahlten- als auch in den bestrahlten Proben proportional zur Strahlendosis (siehe Abb. 11). Der Anteil der vitalen unbestrahlten Lymphozyten fiel dabei 6 h nach Bestrahlung von 93,7 auf 81,7% 48 h nach Bestrahlung ab, wohingegen der vitale Anteil der mit 4 Gy bestrahlten Lymphozyten 6 h nach Bestrahlung von 93,9 auf 30,8% 48 h nach Bestrahlung sank (siehe Abb. 11, a). Im Vergleich dazu stieg der Anteil der früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung signifikant an. Das Maximum an apoptotischen Lymphozyten wurde 48 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy erreicht, wobei 30,8% früh-apoptotische und 38,1% spät-apoptotische Lymphozyten detektiert wurden (siehe Abb. 11, b und c). Neben den bestrahlten Proben nahmen auch die früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten in den Kontrollproben (0

Gy) zu, wobei nach 24 h ca. 11% frühe Apoptosen und nach 48 h ca. 6% späte Apoptosen detektiert werden konnten (siehe Abb. 11, b und c).

Insgesamt wurde durch die durchflusszytometrischen Apoptosemessungen der Lymphozyten nach Bestrahlung ersichtlich, dass mit steigender Strahlendosis der Anteil an vitalen Lymphozyten signifikant abnahm und entsprechend der Anteil an früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten signifikant zunahm. Zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung zeigte sich ein stetiger Anstieg der früh-apoptotischen Lymphozyten mit steigender Dosis. Zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung war der prozentuale Anteil an früh-apoptotischen Zellen nach Bestrahlungen mit 1, 2 und 4 Gy nahezu identisch. Der stetig ansteigende Anteil spät-apoptotischer Zellen dokumentiert das fortwährende apoptotische Absterben der kultivierten Lymphozyten.

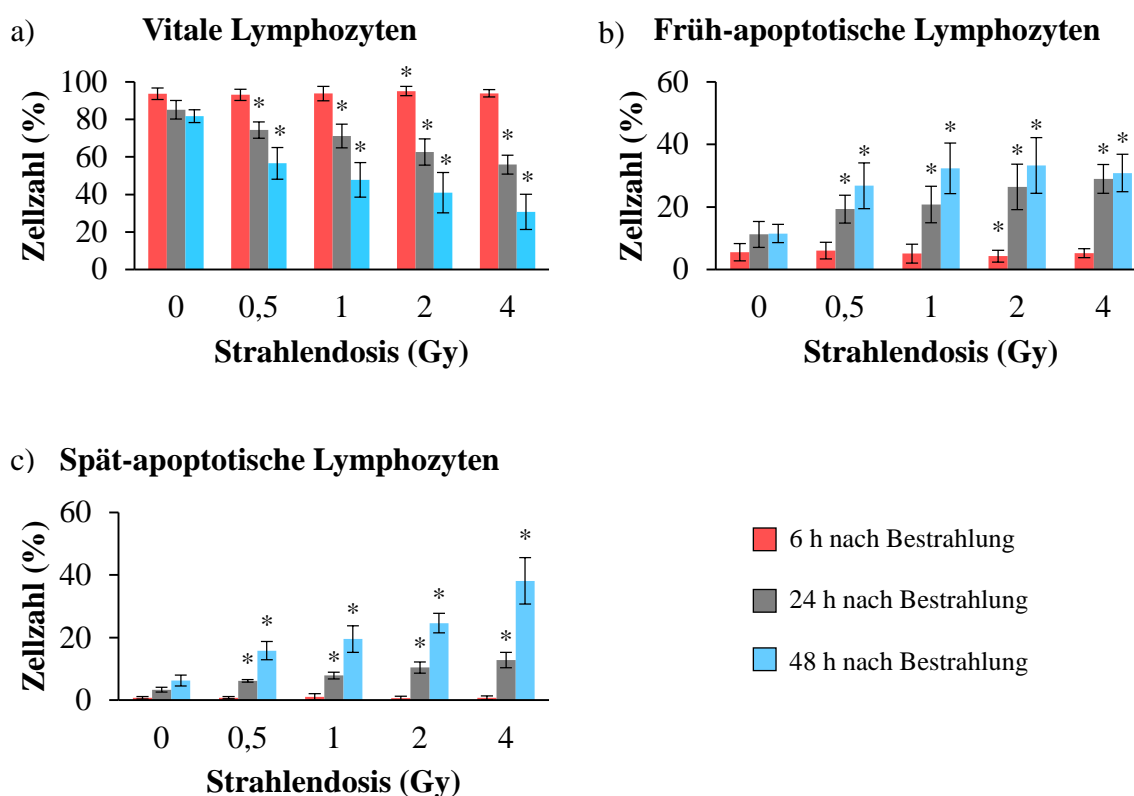


Abb. 11: Darstellung vitaler-, früh- und spät-apoptotischer Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte an den mit 0,5, 1, 2 und 4 Gy γ -bestrahlten Lymphozyten und der unbestrahlten Kontrolle 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung. Insgesamt erniedrigte sich der Anteil der vitalen Lymphozyten mit zunehmender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung (a), wohingegen der Anteil der früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten mit zunehmender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung anstieg (b, c). (Die Standardabweichung resultiert aus Apoptosemessungen von Lymphozyten von fünf verschiedenen Spendern; *p < 0,05 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.)

3.1.2 Qualitätsbestimmung der RNA bestrahlter Lymphozyten

Die Qualität der aus den Lymphozyten isolierten RNA wurde mittels des *Lab on a chip-Systems* (Agilent) überprüft (siehe 2.2.3.1), damit nur vollständig intakte RNA für weitere Experimente herangezogen wurde.

Die RNA-Isolate von sechs Spendern waren stets von hoher Güte. In der Kapillarelektrophorese wurden nur die Banden der 18S rRNA (1874 nt) und der 28S rRNA (4718 nt) detektiert. Zwischen den beiden Banden waren keine Degradationsprodukte sichtbar, was die hohe Intaktheit der aufgetragenen RNA widerspiegelte (siehe Abb. 12). Alle isolierten RNA-Proben wurden vor der Verwendung für weitere Experimente einer Kapillarelektrophorese unterzogen und wiesen RIN-Werte (RNA-Integritätsnummer) von > 8 auf.

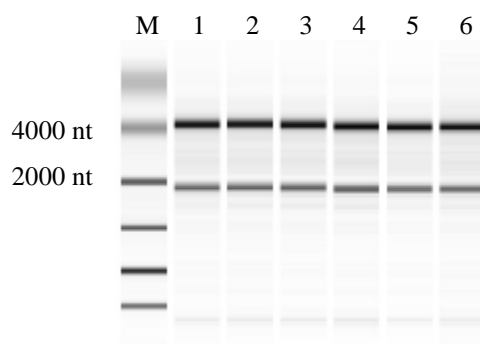


Abb. 12: Kapillarelektrophoretische Darstellung und Analyse der RNA-Isolate mittels Mikrofluidik-System. Die Qualität der RNA wurde durch das Verhältnis von eukaryotischer 18S rRNA (1874 nt) zu eukaryotischer 28S rRNA (4718 nt) bestimmt. Alle aufgetragenen RNA-Proben (1 µl isolierte Gesamt-RNA aus Lymphozyten) wiesen distinkte Banden auf, waren intakt und konnten für Genexpressionsanalysen verwendet werden. M: Marker; 1: RNA Spender-1, 4 Gy, 24 h nach Bestrahlung (nB); 2: RNA Spender-2, 4 Gy, 24 h nB; 3: RNA Spender-3, 4 Gy, 24 h nB; 4: RNA Spender-4, 4 Gy, 24 h nB; 5: RNA Spender-5, 4 Gy, 24 h nB; 6: RNA Spender-6, 4 Gy, 24 h nB.

3.1.3 Signifikant veränderte Genexpressionen in Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung

Für Genexpressionsanalysen in Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung wurden 45 *Microarrays*, basierend auf vier Strahlendosen (0,5, 1, 2, 4 Gy) und der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy), drei Zeitpunkten (6, 24, 48 h) und drei Replikaten, mit gepoolten RNA-Proben von sechs Spendern beladen (siehe 2.2.3.2; 2.2.3.3). Um untersuchen zu können, welche Wirkung die Höhe der applizierten Strahlendosis auf das lymphozytäre Transkriptom ausübt, wurden die *Microarrays* in einem ersten Schritt dahingehend ausgewertet, signifikant veränderte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) zu identifizieren (siehe

2.2.6.2). Dazu wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und anschließend zur Fallzahlkorrektur die Methode von Benjamini und Hochberg angewandt, wobei nach Fallzahlkorrektur nur Gene mit einem p-Wert $< 0,01$ als statistisch signifikant erachtet wurden.

Die Anzahl der signifikant veränderten Gene stieg mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung für alle Strahlendosen deutlich an, wobei die maximale Anzahl an veränderten Genen 48 h nach Bestrahlung erreicht wurde (siehe Tab. 8). Aus den Daten ging weiterhin hervor, dass 6 h nach Bestrahlung der geringste Unterschied an veränderten Genen beim Vergleich der verschiedenen Strahlendosen vorlag. Die Anzahl der veränderten Gene stieg dabei nach einer 0,5 Gy Bestrahlung von 170 auf 269 veränderte Gene nach einer Bestrahlung mit 4 Gy an. 24 h nach Bestrahlung hingegen stieg die Anzahl der signifikant veränderten Gene von 321 nach einer 0,5 Gy Bestrahlung auf 762 Gene nach einer 4 Gy Bestrahlung.

Des Weiteren ließ sich erkennen, dass eine Bestrahlung mit 2 und 4 Gy zu einer sehr ähnlichen Anzahl an veränderten Genen zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung führte. 24 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy wiesen beispielsweise 723 Gene eine signifikante Expressionsänderung auf, wobei nach einer Bestrahlung mit 4 Gy 762 Gene signifikant verändert waren. Die maximale Anzahl von 1448 signifikant veränderten Genen wurde 48 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy erreicht.

Insgesamt belegten die Genexpressionsdaten eindeutig, dass die Anzahl an signifikant veränderten Genen mit steigender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung *in vitro* deutlich zunahm.

Tab. 8: Signifikant veränderte Gene zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung

	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
6 h	170	229	264	269
24 h	321	554	723	762
48 h	678	1066	1393	1448

3.1.4 Induzierte Signalwege nach Hochdosisbestrahlung

Die Genlisten der 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 0,5, 1, 2 und 4 Gy signifikant veränderten Gene (siehe 3.1.3) wurden für Signalweganalysen in die frei zugängliche *online*-Datenbank DAVID eingefügt (siehe 2.2.6.3). Dabei wurde untersucht, welche Signalwege zu den verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit den verschiedenen Strahlendosen

überrepräsentiert waren. Eine Auflistung der den einzelnen Signalwegen zugeordneten, signifikant veränderten Genen befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 8, Tab. 16 – 20).

3.1.4.1 Induzierte Signalwege 6 h nach Hochdosisbestrahlung

Bereits 6 h nach Bestrahlung wurde der P53-Signalweg aktiviert, wobei jeweils 14 Gene nach Bestrahlungen mit 0,5, 1, 2 und 4 Gy diesem Signalweg zugeordnet wurden (siehe Abb. 13). Des Weiteren konnten in den in die Signalweganalysen eingesetzten Genlisten Gene identifiziert werden, die in die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion involviert sind. Dabei stieg die Anzahl der diesem Signalweg zugeordneten Gene mit steigender Strahlendosis an, wobei nach einer Bestrahlung mit 2 und 4 Gy jeweils acht Gene dieses Signalwegs identifiziert wurden. Dem Zellzyklus wurden nach Bestrahlung mit 1, 2 und 4 Gy durch die *online*-Datenbank DAVID jeweils sechs Gene zugeordnet, wohingegen nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy nur fünf Gene dieses Signalwegs induziert waren (siehe Abb. 13). Der Systemische Lupus erythematoses Signalweg hingegen wurde erst nach Bestrahlung mit 2 und 4 Gy aktiviert, wobei vier Gene der in die Analyse eingesetzten Genlisten diesem Signalweg zugeteilt wurden (siehe Abb. 13).

Dem P53-Signalweg wurden durch die mittels der *online*-Datenbank DAVID durchgeführten Signalweganalysen die niedrigsten p-Werte zugeordnet, die zwischen $5,6 \times 10^{-14}$ nach einer Bestrahlung mit 4 Gy und $9,6 \times 10^{-16}$ nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy variierten. Die sehr geringen für den P53-Signalweg beobachteten p-Werte weisen darauf hin, dass dieser Signalweg mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit schon 6 h nach Bestrahlung strahleninduziert aktiviert wurde. Für die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion, den Zellzyklus und den Systemischen Lupus erythematoses Signalweg hingegen wurden stets höhere p-Werte zwischen 8×10^{-2} und $4,2 \times 10^{-3}$ detektiert (siehe Abb. 13).

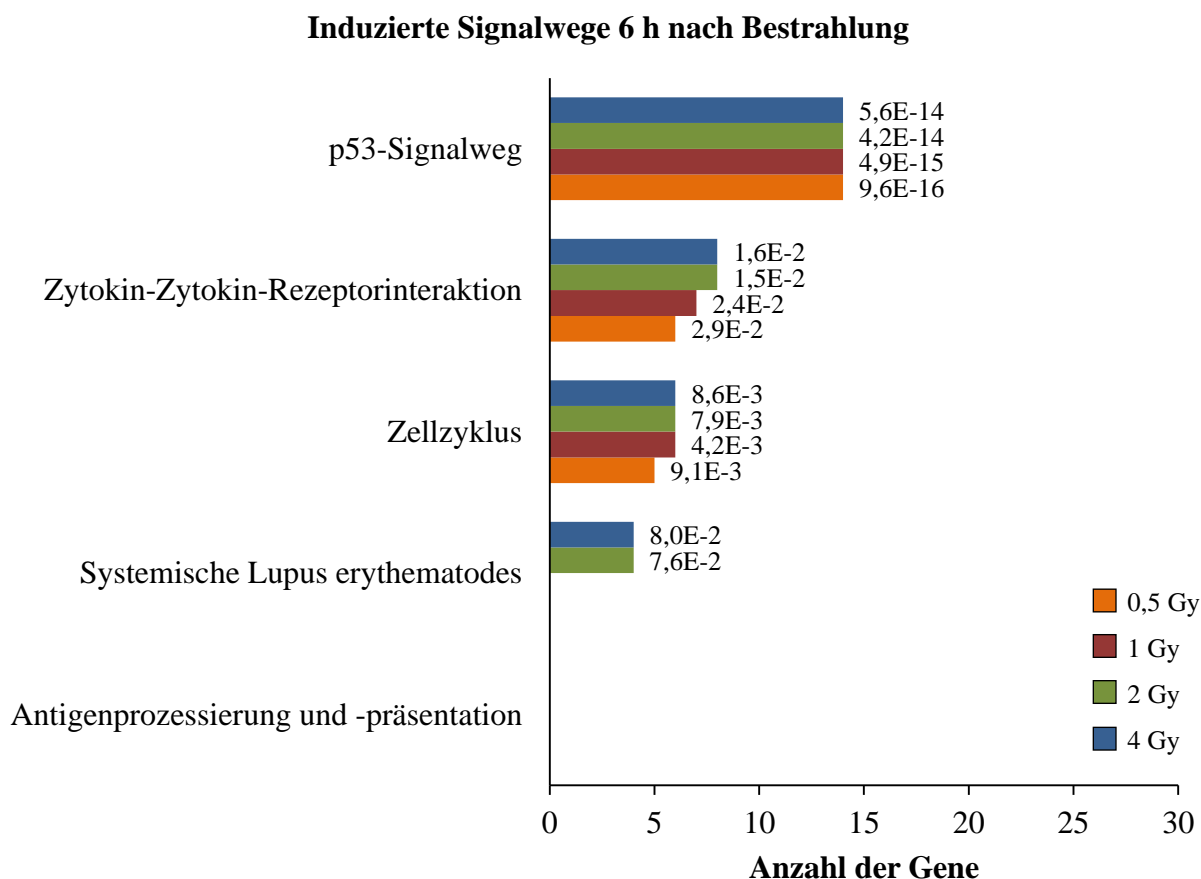


Abb. 13: Darstellung der 6 h nach Bestrahlung induzierten Signalwege. Besonders stark induziert wurde der P53-Signalweg 6 h nach Bestrahlung mit allen vier Dosen (0,5, 1, 2, 4 Gy), wohingegen der Systemische Lupus erythematoses Signalweg nur nach einer Bestrahlung mit 2 und 4 Gy aktiviert wurde. Des Weiteren führte die Bestrahlung mit den vier Strahlendosen zu einer Induktion der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion und des Zellzyklus. (Die rechts neben den Balken befindlichen Zahlen geben die p-Werte der Zuordnung der einzelnen Strahlendosen zu den jeweiligen Signalwegen an.)

3.1.4.2 Induzierte Signalwege 24 h nach Hochdosisbestrahlung

Die mittels der *online*-Datenbank DAVID durchgeführten Signalweganalysen zeigten 24 h nach Bestrahlung eine deutliche Aktivierung des Systemischen Lupus erythematoses Signalwegs (siehe Abb. 14). Auffallend war dabei, dass eine Bestrahlung mit 0,5 Gy zu einer Aktivierung von lediglich acht Genen führte, wohingegen eine Bestrahlung mit 1, 2 und 4 Gy eine Aktivierung von 17 bzw. 19 diesem Signalweg zugeordneten Genen erbrachte. Der P53-Signalweg war nach allen Strahlendosen, wie bereits zum 6 h Zeitpunkt, 24 h nach Bestrahlung deutlich aktiviert (siehe Abb. 14). Ebenso wurden Gene, die dem Zellzyklus zugeordnet wurden, mit steigender Strahlendosis verstärkt in ihrer Expression verändert (siehe Abb. 14). Der Signalweg der Antigenprozessierung und -präsentation wurde hingegen erst 24 h ab einer Strahlendosis von 1 Gy induziert, wobei nach Bestrahlungen mit 2 und 4 Gy

diesem Signalweg jeweils neun Gene zugeordnet wurden (siehe Abb. 14). Die meisten signifikant veränderten Gene nach Bestrahlungen mit 2 und 4 Gy wurden mit einem deutlichen Anstieg an signifikant veränderten Gene mit steigender Strahlendosis jedoch der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion zugeteilt (siehe Abb. 14).

Insgesamt wurden für den P53-Signalweg 24 h nach Bestrahlung wiederum die niedrigsten p-Werte errechnet, die zwischen $1,5 \times 10^{-9}$ und $1,9 \times 10^{-12}$ lagen, was auf eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Aktivierung dieses Signalwegs durch die vorangegangene Bestrahlung hinweist. Auch für den Systemischen Lupus erythematoses Signalweg wurden ab einer Strahlendosis von 1 Gy sehr geringe p-Werte zwischen $8,9 \times 10^{-10}$ und $3,7 \times 10^{-10}$ detektiert, weshalb auch dieser Signalweg sehr wahrscheinlich strahleninduziert aktiviert wurde. Bei den Signalwegen des Zellzyklus und der Antigenprozessierung und -präsentation hingegen traten die höchsten p-Werte auf (siehe Abb. 14).

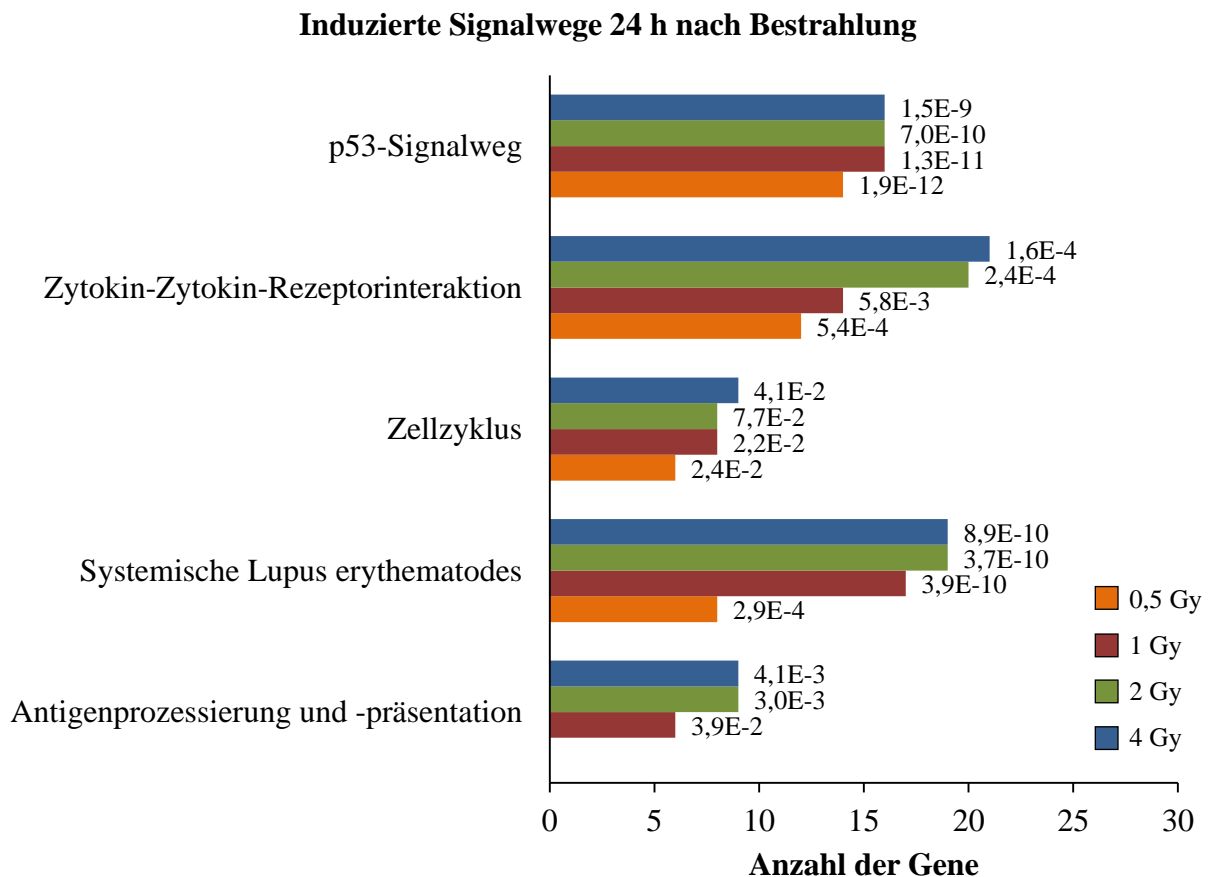


Abb. 14: Darstellung der 24 h nach Bestrahlung induzierten Signalwege. Die Bestrahlung von Lymphozyten mit 2 und 4 Gy führte 24 h nach Bestrahlung zu einer deutlichen Aktivierung der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion, wobei diesem Signalweg auch die meisten nach Bestrahlung signifikant veränderten Gene zugeordnet wurden. Des Weiteren wurde durch die Signalweganalysen eine deutliche Induktion des P53-Signalwegs nach Bestrahlung mit 0,5, 1, 2 und 4 Gy und des Systemischen Lupus erythematoses Signalwegs nach Bestrahlungen mit 1, 2 und 4 Gy detektiert. (Die rechts neben den Balken befindlichen Zahlen geben die p-Werte der Zuordnung der einzelnen Strahlendosen zu den jeweiligen Signalwegen an.)

3.1.4.3 Induzierte Signalwege 48 h nach Hochdosisbestrahlung

Die Signalweganalysen der signifikant veränderten Gene zeigten auch 48 h nach Bestrahlung eine deutliche Induktion des Systemischen Lupus erythematoses Signalwegs. Die Anzahl der diesem Signalweg zugeordneten Gene nahm mit steigender Strahlendosis zu (siehe Abb. 15). Nach einer Bestrahlung mit 2 und 4 Gy wurden diesem Signalweg dabei jeweils 23 Gene zugeordnet. Auch der P53-Signalweg wies 48 h nach Bestrahlung noch eine deutliche Anzahl an veränderten Genen auf, wobei nach einer Bestrahlung mit 4 Gy die maximale Anzahl von 14 differentiell exprimierten Genen erreicht wurde (siehe Abb. 15). Für den Signalweg der Antigenprozessierung und -präsentation hingegen wurde mit steigender Strahlendosis eine Zunahme der signifikant veränderten Gene detektiert, wobei nach Bestrahlungen mit 2 und 4 Gy die maximale Anzahl von jeweils 17 veränderten Genen beobachtet wurde (siehe Abb. 15). Die meisten signifikant veränderten Gene wurden 48 h nach Bestrahlung jedoch der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion zugeordnet, wobei die Anzahl an signifikant veränderten Genen auch bei diesem Signalweg mit zunehmender Strahlendosis anstieg und nach einer Bestrahlung mit 4 Gy diesem Signalweg 28 signifikant veränderte Gene zugeordnet wurden (siehe Abb. 15).

Die niedrigsten p-Werte wurden 48 h nach Bestrahlung für den Systemischen Lupus erythematoses Signalweg beobachtet, wobei der geringste p-Wert von $9,7 \times 10^{-12}$ nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy erreicht wurde. Auch dem P53-Signalweg wurde nach einer 0,5 Gy Bestrahlung der geringste p-Wert von $1,7 \times 10^{-6}$ zugeordnet, der jedoch mit zunehmender Strahlendosis weiter anstieg. Obwohl der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion die meisten signifikant veränderten Gene zugeordnet wurden, wies dieser Signalweg die höchsten p-Werte auf (siehe Abb. 15).

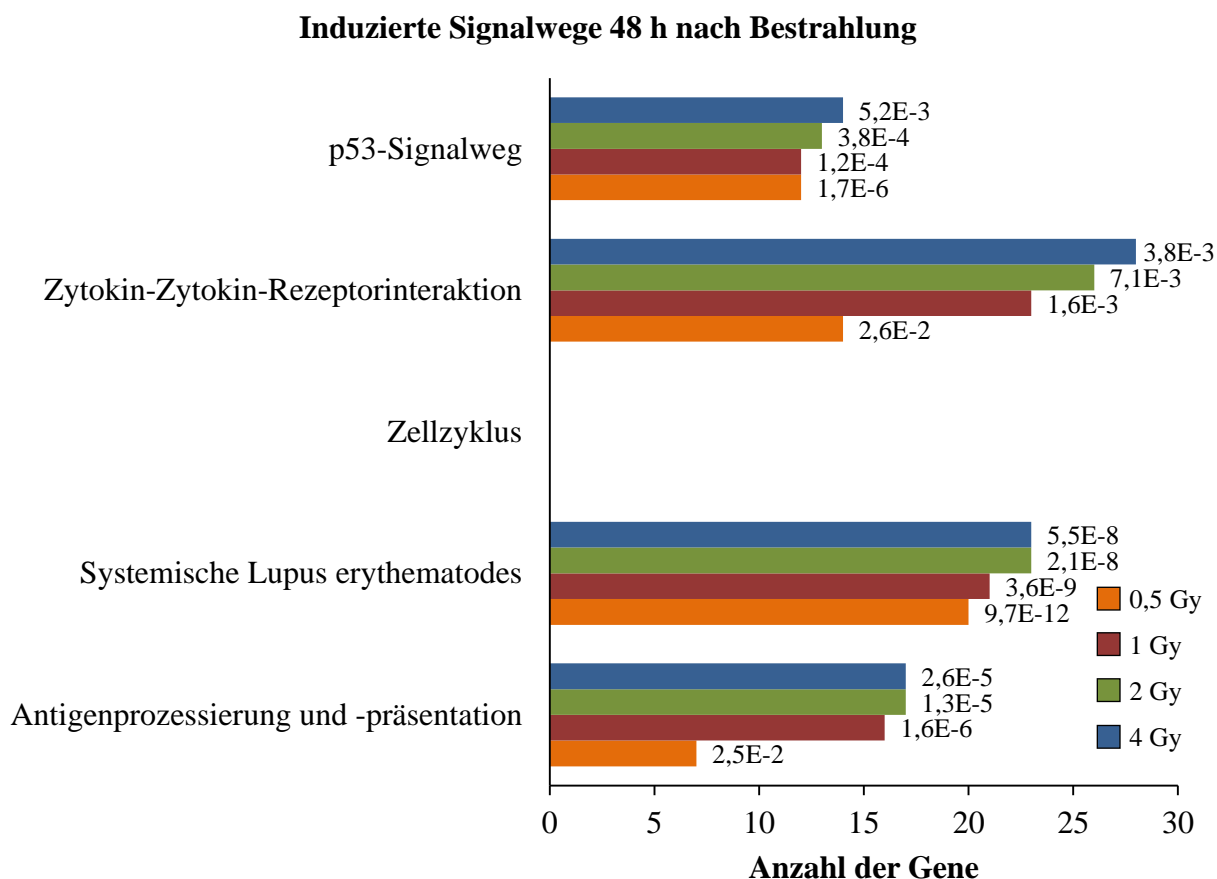
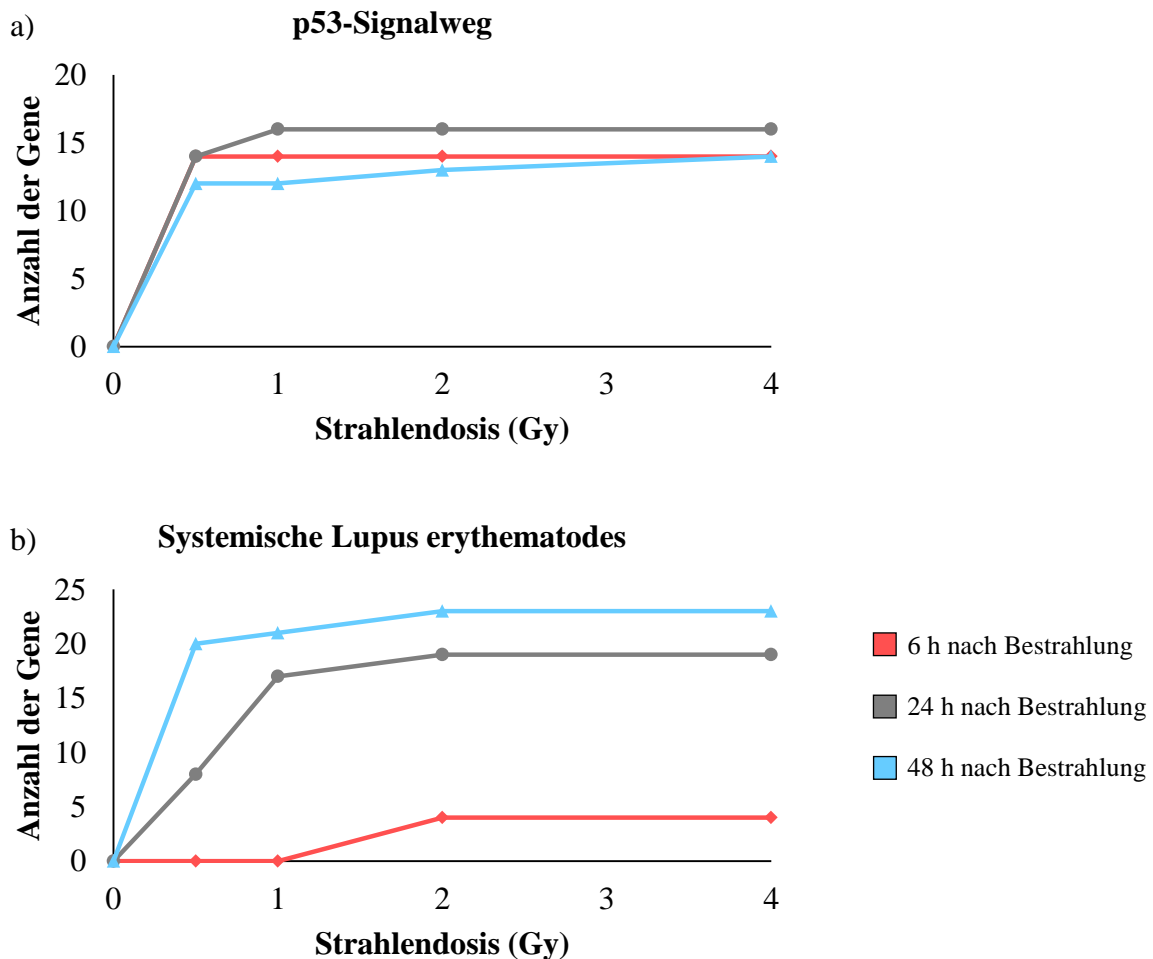


Abb. 15: Darstellung der 48 h nach Bestrahlung induzierten Signalwege. Die Signalweganalysen zeigten, dass auch 48 h nach Bestrahlung eine deutliche Aktivierung des Systemischen Lupus erythematoses, des P53-Signalwegs und der Antigenprozessierung und -präsentation vorlag. Die meisten nach Bestrahlung signifikant veränderten Gene wurden jedoch dem Signalweg der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion zugeordnet, wobei die Anzahl der diesem Signalweg zugeordneten Gene mit steigender Strahlendosis zunahm. (Die rechts neben den Balken befindlichen Zahlen geben die p-Werte der Zuordnung der einzelnen Strahlendosen zu den jeweiligen Signalwegen an.)

3.1.4.4 Zusammenfassung der zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hochdosisbestrahlung induzierten Signalwege

Schlussfolgernd geht aus den Signalweganalysen hervor, dass bereits 6 h nach Bestrahlung der P53-Signalweg für alle Strahlendosen signifikant aktiviert wurde (siehe Abb. 3.6, a). Die Anzahl an signifikant veränderten Genen, die diesem Signalweg zugeordnet wurden, nahm dabei mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung nur noch geringfügig zu. Der Systemische Lupus erythematoses Signalweg hingegen wies eine verzögerte Aktivierung nach Bestrahlung auf, was sich daran erkennen ließ, dass erst 24 und 48 h nach Bestrahlung eine hohe Anzahl an veränderten Genen diesem Signalweg zugeteilt werden konnte (siehe Abb. 3.6, b). Die verzögerte Induktion des Systemischen Lupus erythematoses Signalwegs wurde dabei

besonders nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy deutlich, da erst 48 h nach Bestrahlung mit dieser Strahlendosis annähernd gleich viele Gene wie nach Bestrahlungen mit 1, 2 und 4 Gy verändert exprimiert wurden. Auch für den Signalweg der Antigenprozessierung und –präsentation wurde eine verzögerte Aktivierung beobachtet (siehe Abb. 3.6, c). Erst 24 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy wurden diesem Signalweg Gene zugeordnet. Dabei stieg die Anzahl der signifikant veränderten und diesem Signalweg zugeordneten Gene mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung und steigender Strahlendosis an. Eine Zunahme an signifikant veränderten Genen mit steigender Dosis und Zeit nach Bestrahlung wurde auch für den Signalweg der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion detektiert (siehe Abb. 13, 14, 15), wohingegen für den Zellzyklus eine frühe Aktivierung beobachtet wurde, die jedoch 48 h nach Bestrahlung nicht mehr nachweisbar war (siehe Abb. 15).



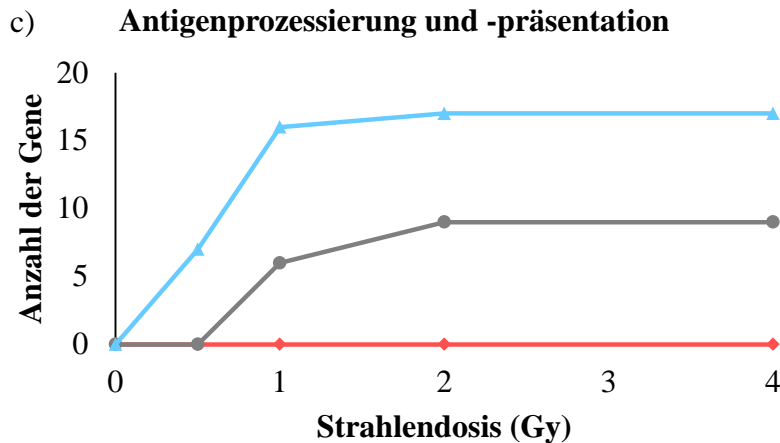


Abb. 16: Anzahl der den verschiedenen Signalwegen zugeordneten und signifikant veränderten Gene. Für den P53-Signalweg wurde eine frühe Aktivierung schon 6 h nach Bestrahlung detektiert, wobei die Anzahl an signifikant veränderten Genen nach Bestrahlung mit allen Dosen (0,5, 1, 2, 4 Gy) gleich war (a). Der Systemische Lupus erythematoses Signalweg wies eine verzögerte Induktion nach Bestrahlung auf, wobei erst nach 48 h für alle vier Dosen eine ähnliche Anzahl an signifikant veränderten Genen detektiert wurde (b). Auch für den Signalweg der Antigenprozessierung und –präsentation wurde eine verzögerte Induktion detektiert, wobei diesem Signalweg 6 h nach Bestrahlung kein Gen zugeordnet wurde (c).

3.1.5 Tiefgreifende Analyse der 6, 24 und 48 h nach Hochdosisbestrahlung induzierten Signalwege

Nach der dosis- und zeitabhängigen Untersuchung signifikant veränderter Gene nach Bestrahlung (siehe 3.1.3) und einer quantitativen Zuordnung dieser Gene zu verschiedenen Signalwegen (siehe 3.1.4.), wurden tiefgreifende Analysen der am deutlichsten induzierten Signalwege, des P53-Signalwegs, des Systemischen Lupus erythematoses Signalwegs und der Antigenprozessierung und –präsentation, durchgeführt. Dazu wurden die Genlisten der 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 4 Gy signifikant veränderten Gene verwendet, da diese die meisten Gene enthielten und diese Gene zudem auch meist in den nach Bestrahlungen mit 0,5, 1 und 2 Gy generierten Genlisten enthalten waren.

3.1.5.1 Der P53-Signalweg

Die durchgeführten Signalweganalysen zeigten, dass der P53-Signalweg zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung mit den vier verschiedenen Strahlendosen signifikant aktiviert wurde (siehe 3.1.4). Ausschließlich 6 h nach Bestrahlung differentiell exprimiert wurden *P21* und *PERP*, 24 h nach Bestrahlung *PIDD* und 48 h nach Bestrahlung *ATM* und *IGF-BP3* (siehe Abb. 17). Für *WIP1* wurde 6 und 24 h nach Bestrahlung eine signifikant veränderte

Genexpression detektiert, wohingegen für *PAG608* 24 und 48 h nach Bestrahlung eine signifikant veränderte Genexpression gemessen wurde (siehe Abb. 17). Zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung differentiell exprimiert wurden die am Zellzyklusarrest beteiligten Gene *CYCLIN D* und *GADD45* und die Apoptose-assoziierten Gene *FAS*, *DR5*, *BAX*, *PUMA* und *PIGs* (siehe Abb. 17). Außerdem wurden die an der DNA-Reparatur beteiligten Gene *P48*, *GADD45* und *SESN1* und die an der negativen Rückkopplung und Regulation des P53-Signalwegs beteiligten Gene *MDM2* und *CYCLIN G* zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung als differentiell exprimiert identifiziert (siehe Abb. 17).

Mittels der Analyse der Expressionsdaten wurde nach der Zuordnung der signifikant veränderten Gene zu den Signalwegen untersucht, ob die jeweiligen Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) eine Hoch- oder Runterregulation nach Bestrahlung aufwiesen. Dabei wurde für die nach 6 h signifikant veränderten Gene *P21* und *PERP* eine Hochregulation detektiert, wohingegen für das 24 h nach Bestrahlung signifikant veränderte Gen *PIDD* und für die nur 48 h nach Bestrahlung differentiell exprimierten Gene *ATM* und *IGF-BP3* eine Runterregulationen gemessen wurden (siehe Abb. 17). Die Apoptose-assoziierten Gene *DR5*, *PUMA*, *BAX* und *PIGs* wiesen zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung eine Hochregulation der Genexpression auf, wogegen *PAG608* diese nur 24 und 48 h nach Bestrahlung zeigte (siehe Abb. 17). Für *FAS* hingegen wurde eine Runterregulation insbesondere 6 h nach Bestrahlung detektiert. Die der DNA-Reparatur zugeordneten Gene *GADD45* und *SESN1* waren zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung hochreguliert, wohingegen für *P48* zu allen untersuchten Zeitpunkten die Genexpression runterreguliert war (siehe Abb. 17). Die der negativen Rückkopplung und der Regulation des P53-Signalwegs zugeordneten Gene *MDM2*, *CYCLIN G* und *WIP1* wurden, bis auf den 48 h Zeitpunkt für *WIP1*, zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung hochreguliert (siehe Abb. 17).

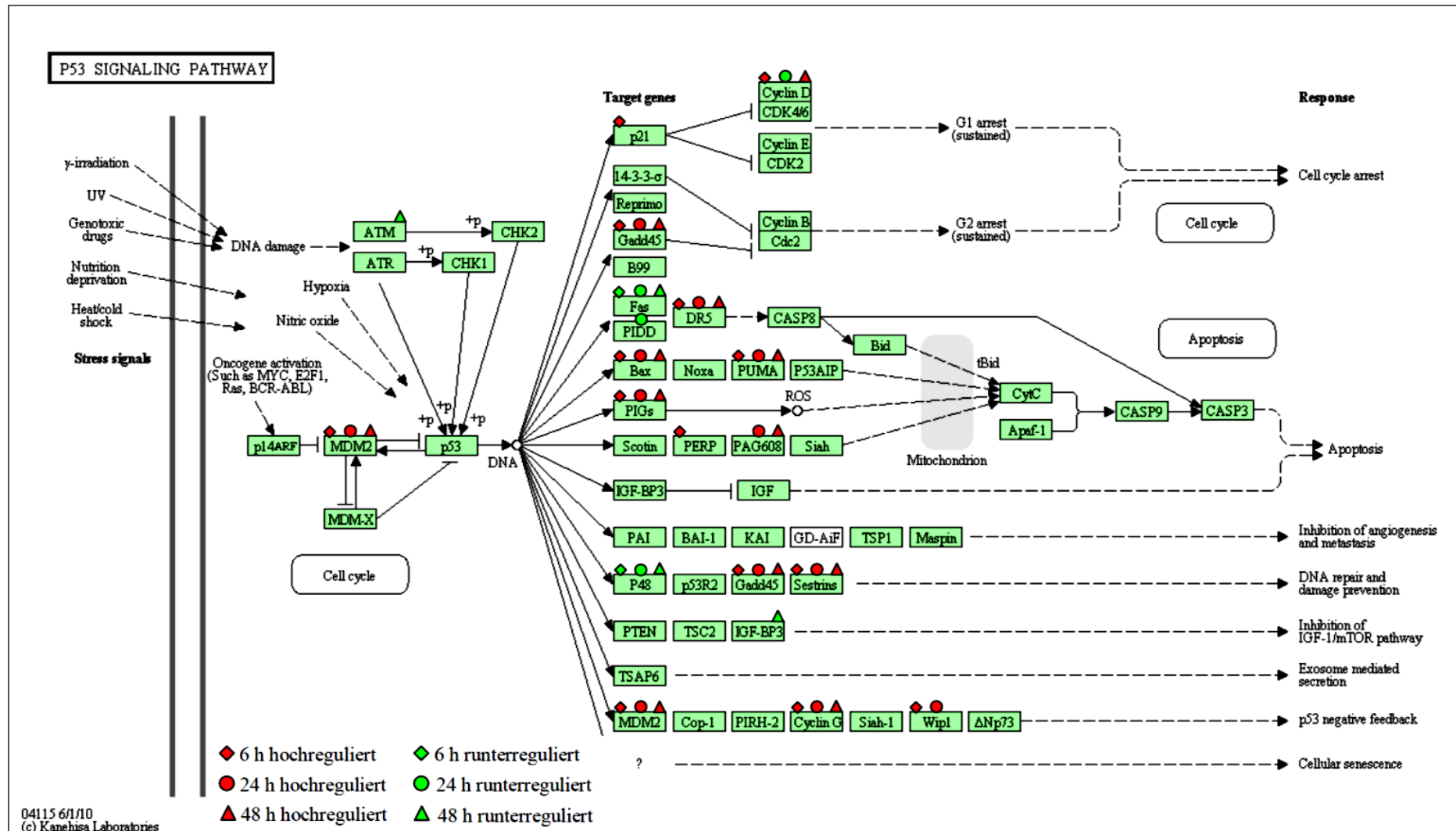


Abb. 17: Darstellung des P53-Signalwegs. Die Anzahl differentiell exprimierter Gene, die dem P53-Signalweg zugeordnet wurden, nahm mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung zu. 6 h nach Bestrahlung waren schon an der Apoptose und an der DNA-Reparatur beteiligte Gene hochreguliert, deren Expression auch 24 und 48 h nach Bestrahlung signifikant verändert blieb (modifiziert nach Kanehisa Laboratories).

3.1.5.2 Der Systemische Lupus erythematoses Signalweg

Die Anzahl der dem Systemischen Lupus erythematoses Signalweg zugeordneten Gene stieg mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung an und erreichte das Maximum 48 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy (siehe 3.1.4). Dieser Signalweg wurde besonders 24 und 48 h nach Bestrahlung aktiviert. 6 h nach Bestrahlung wurde das Gen *CD40* und ausschließlich 48 h nach Bestrahlung die Gene *C3*, *CD40L* und *IFN- γ* signifikant verändert exprimiert (siehe Abb. 18). Sowohl 24 als auch 48 h nach Bestrahlung wiesen die Histongene *H2A*, *H2B*, *H3* und *H4* und die Gene *C7* und *MAC* eine differentielle Expression auf (siehe Abb. 18).

Eine tiefgreifende Analyse der Expressionsdaten zeigte, dass die Histongene *H2A*, *H2B*, *H3* und *H4* eine Hochregulation der Expression nach Bestrahlung aufwiesen (siehe Abb. 18). Auch für *CD40* wurde 6 h nach Bestrahlung eine Hochregulation gemessen, wohingegen für *CD40L* und *IFN- γ* eine Runterregulation 48 h nach Bestrahlung detektiert wurde (siehe Abb. 18).

3.1.5.3 Der Antigenprozessierungs und –präsentations Signalweg

Die Signalweganalysen der Genexpressionsänderungen in bestrahlten Lymphozyten zeigten, dass auch die Antigenprozessierung und –präsentation 24 h nach Bestrahlung ab einer Strahlendosis von 1 Gy aktiviert wurde (siehe 3.1.4). Die wichtigsten diesem Signalweg zugeordneten Gene veränderten sich erst 48 h nach Bestrahlung signifikant, wie beispielsweise die Gene *MHCI*, *CALR*, *CD8* und *MHCII* (siehe Abb. 19). Sowohl 24 als auch 48 h nach Bestrahlung wurde *KIR* als signifikant verändert detektiert (siehe Abb. 19).

Aus den Expressionsdaten der differentiell exprimierten Gene wurde ersichtlich, dass *MHCI* und *CALR* nach Bestrahlung hochreguliert wurden, wohingegen *CD8* und *KIR* eine Runterregulation aufwiesen (siehe Abb. 19).

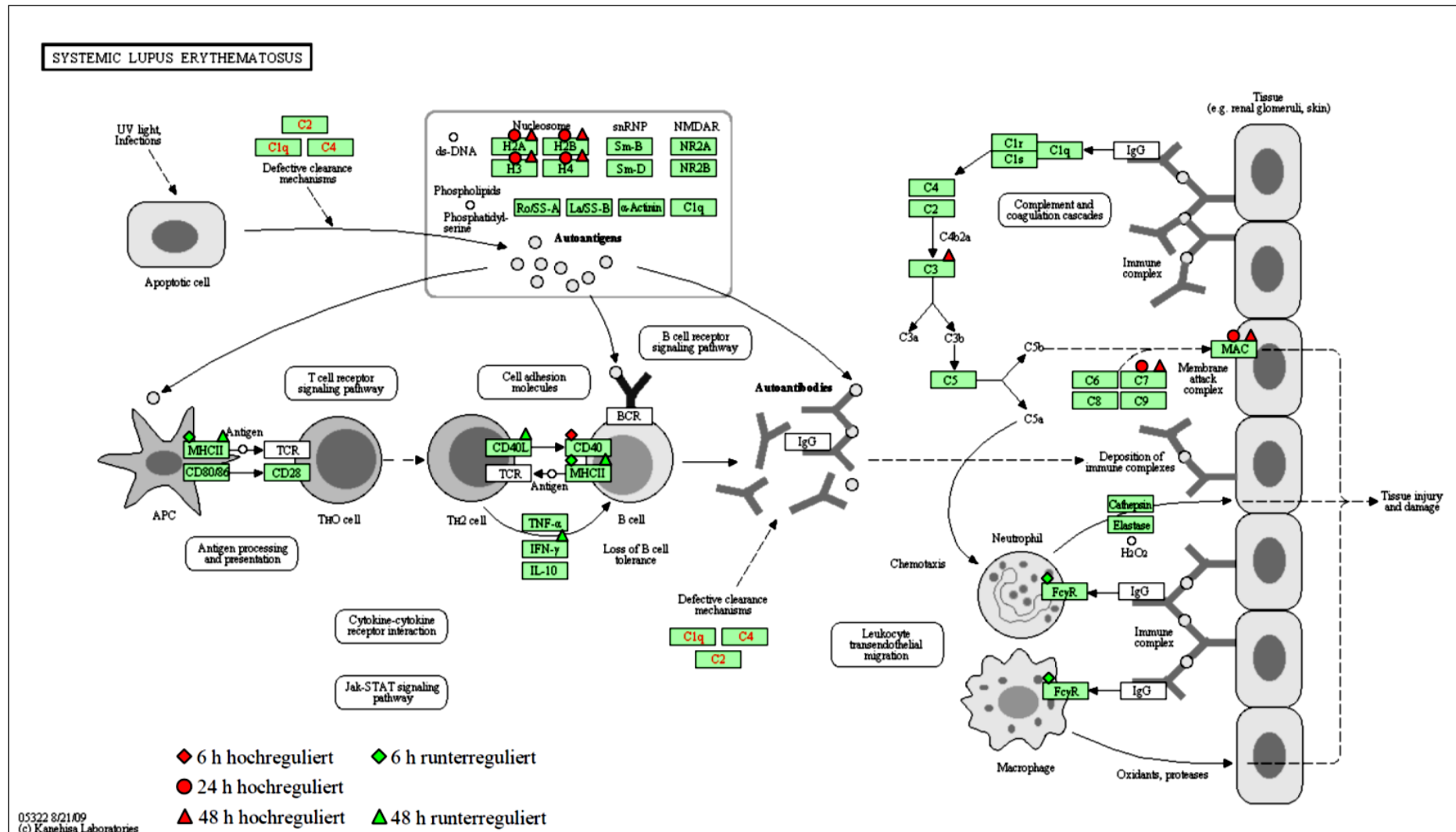


Abb. 18: Darstellung des Systemischen Lupus erythematosus Signalwegs. 24 und 48 h nach Bestrahlung wurden besonders Histongene als signifikant verändert detektiert, wobei diese eine Hochregulation nach Bestrahlung aufwiesen (modifiziert nach Kanehisa Laboratories).

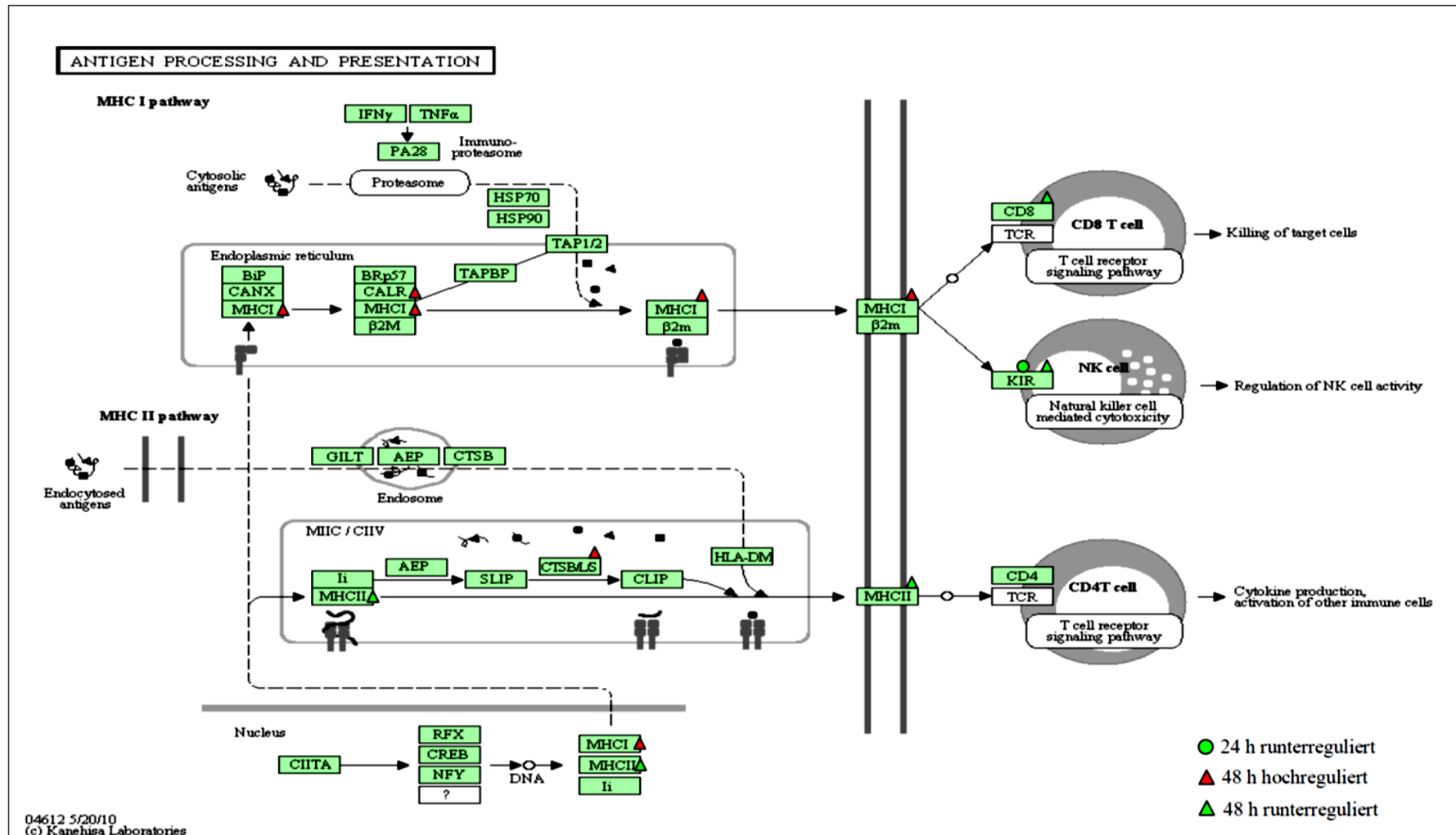


Abb. 19: Darstellung der Antigenprozessierung und -präsentation. Die meisten Gene dieses Signalwegs lagen erst 48 h nach Bestrahlung signifikant verändert vor. 6 h nach Bestrahlung wurden keine Gene dieses Signalwegs als differentiell exprimiert identifiziert (modifiziert nach Kanehisa Laboratories).

3.1.6 Expressionsanalyse von Histongenen

Mithilfe der durchgeführten Signalweganalysen (siehe 3.1.4) wurde eine deutliche Aktivierung des Systemischen Lupus erythematodes Signalwegs nachgewiesen, wobei die diesem Signalweg zugeordneten Histongene 24 und 48 h nach Bestrahlung hochreguliert waren (siehe 3.1.5). Die Validierung der mittels der *Microarrays* detektierten Hochregulation der Histongene erfolgte an zwei ausgewählten Genen, deren Expression durch qRT-PCR-Messungen detektiert wurde (siehe 2.2.3.4).

Das Expressionsprofil von *HIST1H2AL* zeigte, dass bei diesem Gen nach Bestrahlung eine deutliche Hochregulation vorlag (siehe Abb. 20, a). 24 h nach Bestrahlung war die Expression von *HIST1H2AL* etwa doppelt so hoch wie die Expression des Gens in der Kontrolle und stieg mit zunehmender Strahlendosis nur geringfügig an. Demgegenüber wurde für *HIST1H2AL* ein deutlicher Expressionsanstieg 48 h nach Bestrahlung mit zunehmender Strahlendosis festgestellt, der nach einer Bestrahlung mit 4 Gy die vierfache Expression des Gens in der Kontrolle erreichte. Für *HIST1H4A* hingegen wurde ein weitaus geringerer Expressionsanstieg detektiert. Die maximale Expression dieses Gens wurde dabei 24 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy gemessen und war im Vergleich zur Kontrolle 1,67-fach erhöht (siehe Abb. 20, b).

Insgesamt wurde durch die Expressionsmessungen von *HIST1H2AL* und *HIST1H4A* ein Anstieg der Expression nach Bestrahlung beobachtet, wobei für das Gen *HIST1H2AL* ein besonders deutlicher Expressionsanstieg gezeigt werden konnte.

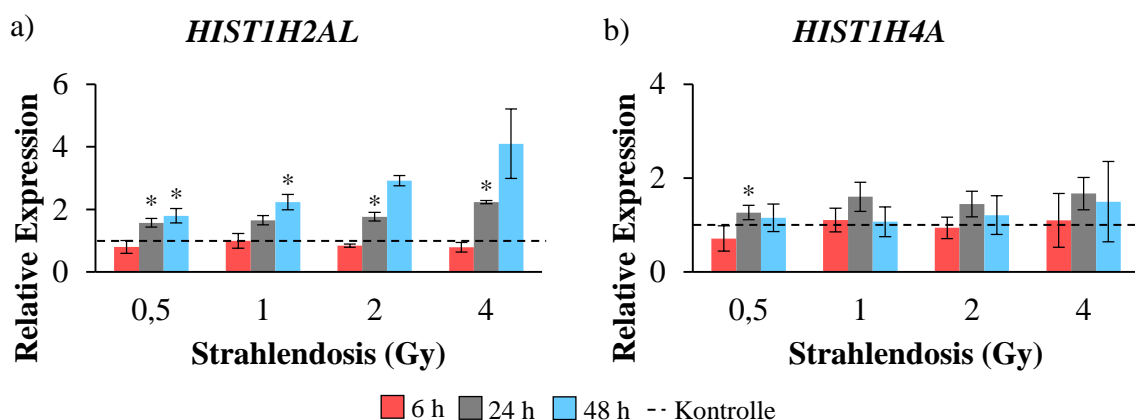


Abb. 20: Expressionsanalysen der Gene *HIST1H2AL* und *HIST1H4A*. Die mittels qRT-PCR gemessenen Expressionen von *HIST1H2AL* und *HIST1H4A* zeigten, dass besonders *HIST1H2AL* 24 und 48 h nach Bestrahlung einen deutlichen Anstieg der Expression aufwies. Für *HIST1H4A* wurde ein geringer Expressionsanstieg detektiert, der 24 h nach Bestrahlung am höchsten war. (Die Standardabweichung resultiert aus qRT-PCR-Messungen der RNA-Proben von drei verschiedenen Spendern; *p < 0,05 von der niedrigeren zur nächst höheren Strahlendosis.)

3.2 Identifizierung von Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung

Die Selektion von Markergenen für die retrospektive Dosisabschätzung nach einer Hochdosisbestrahlung erfolgte, indem die unter 3.1.3 beschriebenen *Microarrays* mittels einer 9-fachen Kreuzvalidierung ausgewertet wurden (siehe 2.2.6.4). Dabei wurden insgesamt 900 Genlisten generiert, aus welchen die zehn Gene, die den größten Expressionsunterschied nach Bestrahlung aufwiesen, ausgewählt wurden.

Die größten Expressionsunterschiede im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle wiesen nach der 9-fachen Kreuzvalidierung 16 Gene auf (siehe Tab. 9). Dabei zeigte sich, dass die ersten sieben Gene, *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *VWCE*, *SPATA18*, *DOK7* und *LGR6*, in jeder der während der 9-fachen Kreuzvalidierung generierten 900 Genlisten vorhanden waren. Des Weiteren wurden Gene identifiziert, die in mehr als der Hälfte der Genlisten vorhanden waren, wie *PRICKLE*, *RP4-742C19.3* und *ISG20L1*. Die anderen, aus der Analyse hervorgehenden, Markergene für die Biodosimetrie wiesen teilweise deutlich geringere Selektionshäufigkeiten auf, wobei *CNTNAP2* nur in 41, *C8orf38* in 26 und *E2F7* in 18 der 900 Genlisten enthalten waren.

Tab. 9: Markergene für Dosiszuordnungen nach Hochdosisbestrahlung basierend auf der Selektionshäufigkeit (modifiziert nach Boldt *et al.*, 2012; rot markierte Gene wurde in weitere Experimente eingesetzt)

Genname	Anzahl der Detektionen
<i>FDXR</i>	900
<i>TNFSF4</i>	900
<i>PHLDA3</i>	900
<i>VWCE</i>	900
<i>SPATA18</i>	900
<i>DOK7</i>	900
<i>LGR6</i>	900
<i>PRICKLE1</i>	674
<i>RP4-742C19.3</i>	599
<i>ISG20L1</i>	565
<i>LOC283454</i>	371
<i>TCL1A</i>	238
<i>THC2651023</i>	168
<i>CNTNAP2</i>	41
<i>C8orf38</i>	26
<i>E2F7</i>	18

Die *k-Nearest-Neighbour* Klassifikation mit den 16 potenziellen Markergenen zeigte, dass sowohl die unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) als auch die mit 0,5 Gy bestrahlten Proben mit einer Sensitivität von 100% der richtigen Strahlendosis zugeordnet werden konnten (siehe Tab. 10). Des Weiteren wurde auch für die mit 4 Gy bestrahlten Proben eine sehr hohe Sensitivität von 97,9% erreicht, wohingegen die mit 1 und 2 Gy bestrahlten Proben etwas geringere Werte für die Sensitivität aufwiesen (siehe Tab. 10). Für die Spezifität wurden nach einer Bestrahlung mit 1, 2 und 4 Gy höhere Werte als für die Sensitivität erreicht, nämlich 97,5%, 99,8% und 99,2%. Die unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) wiesen eine Spezifität von 100% auf, wohingegen die mit 0,5 Gy bestrahlten Proben mit 98,1% einen etwas geringeren Wert für die Spezifität als für die Sensitivität erhielten (siehe Tab. 10).

Insgesamt wurde nach der *k-Nearest-Neighbour* Klassifikation (siehe 2.2.6.4) mit den 16 potentiellen Markergenen eine durchschnittliche Sensitivität der Dosiszuordnung von 95,7% und eine durchschnittliche Spezifität der Dosiszuordnung von 98,9% ermittelt (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Vorhersagegenauigkeit der einzelnen Strahlendosen nach Selektion geeigneter Markergene (modifiziert nach Boldt *et al.*, 2012)

Dosis (Gy)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0	100	100
0,5	100	98,1
1	90,3	97,5
2	90,1	99,8
4	97,9	99,2
Durchschnitt	95,7	98,9

3.2.1 Validierung der *Microarray*-Ergebnisse nach Hochdosisbestrahlung

3.2.1.1 Überprüfung der *Primer*-Spezifität

Die mittels *Microarrays* generierten Expressionsdaten lymphozytärer Gene nach Bestrahlung wurden durch qRT-PCR-Messungen für ausgewählte Gene validiert. Dazu wurden zunächst *Primer* generiert (siehe 2.1.5), deren Spezifität gegen die selektierten Gene überprüft wurde. Hierzu wurde isolierte RNA in cDNA (siehe 2.2.3.5) umgeschrieben und dann in eine PCR (siehe 2.2.4.1) mit den für die jeweiligen Gene spezifischen *Primern* eingesetzt. Die Amplifikate wurden im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen, um anhand der Laufgeschwindigkeit die Produktgröße zu bestimmen. Die Produktgröße gibt dabei einen deutlichen Hinweis darauf, ob die *Primer* spezifisch gebunden haben. Die Laufhöhe der getesteten Amplifikate stimmte für alle Produkte mit der Laufhöhe überein, die bei Verwendung der jeweiligen *Primer* errechnet wurde, was auf eine sehr spezifische Bindung der *Primer* hindeutete (siehe Abb. 21). Die *Primer* wurden daher für weitere Genexpressionsuntersuchungen verwendet.

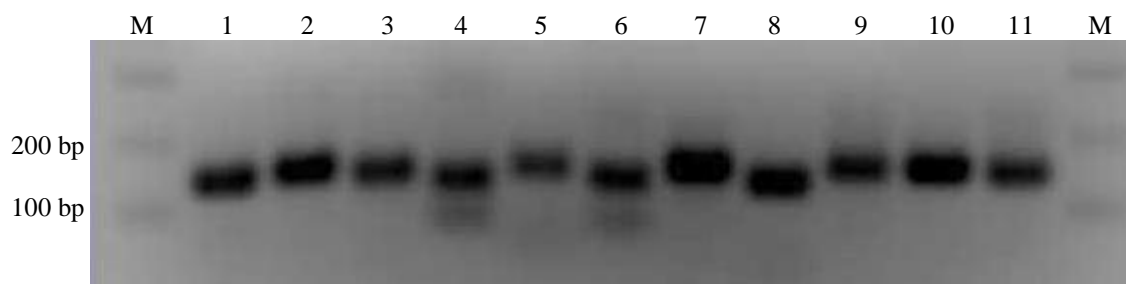


Abb. 21: Agarosegel zur Überprüfung der Spezifität der Primer für qRT-PCR-Messungen. Um die Spezifität der *Primer* zu überprüfen, wurde zunächst RNA in cDNA umgeschrieben und diese anschließend in PCR-Reaktionen mit genspezifischen *Primern* eingesetzt. Aufgetragen wurden 10 µl des PCR-Produkts. M: Marker; 1: *FDXR* 134 bp; 2: *TNFSF4* 138 bp; 3: *PHLDA3* 127 bp; 4: *SPATA18* 116 bp; 5: *VWCE* 135 bp; 6: *DOK7* 123 bp; 7: *GAPDH* 142 bp; 8: *LY6G5C* 122 bp; 9: *PFKFB3* 141 bp; 10: *HIST1H2AL* 146 bp; 11: *HIST1H4A* 141 bp. Alle PCR-Produkte wiesen die richtige Länge auf, was auf ein spezifisches Binden der *Primer* hindeutete.

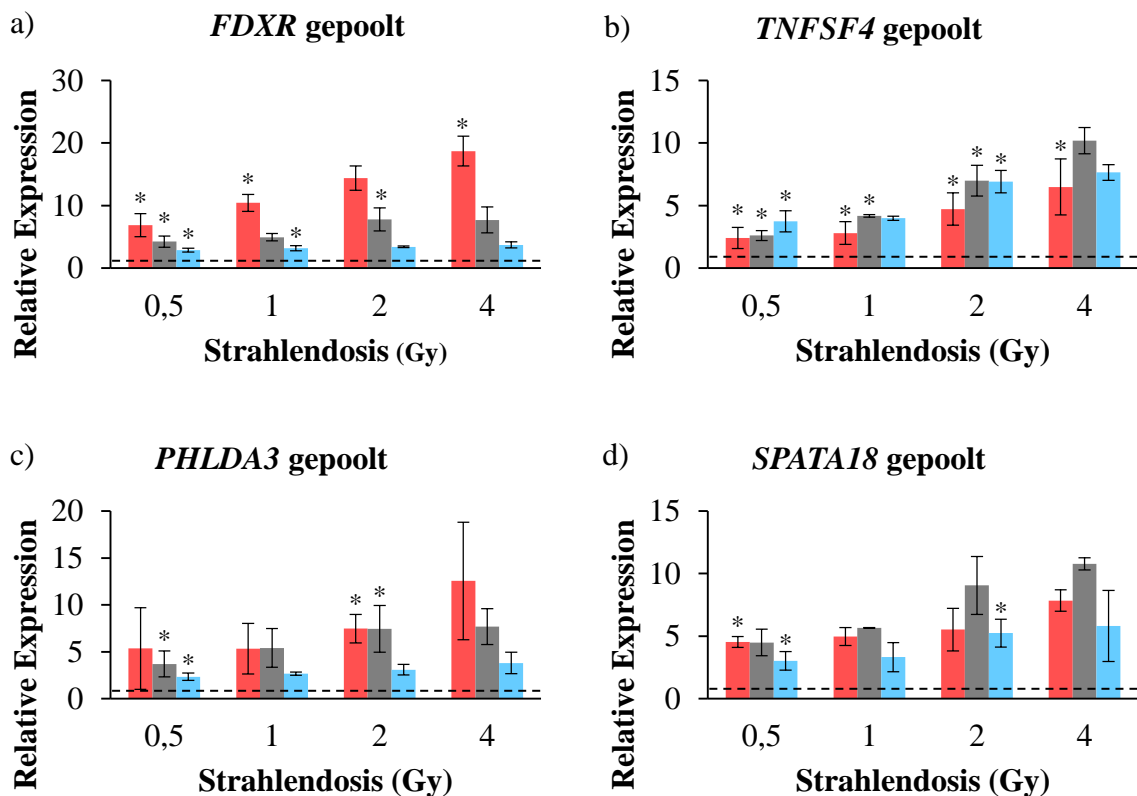
3.2.1.2 Validierung der *Microarray*-Ergebnisse an gepoolten Proben

Nach der Identifizierung von 16 potenziellen Markergenen (siehe Tab. 9) für die Dosiszuordnung nach Hochdosisbestrahlung wurden die sieben robustesten Gene für die Validierung der *Microarray*-Ergebnisse herangezogen. Dazu wurden die Gene *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *VWCE*, *SPATA18*, *DOK7* und *LGR6* selektiert, die in jeder der 900 Genlisten enthalten waren. Um die Expressionsänderungen dieser Gene nach Bestrahlung validieren zu können, wurden die gepoolten RNA-Proben der sechs gesunden Spender, die auch für die *Microarray*-Experimente verwendet wurden (siehe 2.2.3.3; 3.1.3), mit genspezifischen *Primern* in qRT-PCR-Messungen eingesetzt (siehe 2.2.3.4). Dabei wurden die relativen Expressionen der einzelnen Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle miteinander verglichen.

Für *FDXR* und *PHLDA3* wurde die höchste Expression 6 h nach Bestrahlung gemessen, die mit zunehmender Strahlendosis weiter anstieg (siehe Abb. 22, a und c). Der maximale Expressionsanstieg für beide Gene wurde 6 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy erreicht, wobei die Expression von *FDXR* 18,7-mal und die Expression von *PHLDA3* 12,5-mal höher als die Expression der Gene in der unbestrahlten Kontrolle war. Im Gegensatz dazu wurden für *TNFSF4* die größten Expressionsanstiege 24 und 48 h nach Bestrahlung gemessen, wobei die Expressionswerte der mit 0,5, 1 und 2 Gy bestrahlten Proben sehr ähnlich waren und erst nach einer 4 Gy Bestrahlung deutliche Expressionsunterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten detektiert wurden (siehe Abb. 22, b). Für *SPATA18* wurden die größten Expressionsanstiege nach Bestrahlungen mit 2 und 4 Gy gemessen. Dabei konnte in den gepoolten Proben 24 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy die höchste Expression von *SPATA18* detektiert werden, die

10,8-mal höher als die Expression von *SPATA18* in der Kontrolle war (siehe Abb. 22, d). Die insgesamt größten Expressionssteigerungen in den gepoolten RNA-Proben wurden für *VWCE* gemessen. Die Expression von *VWCE* erreichte 24 h nach einer 4 Gy Bestrahlung ihr Maximum und war 27,8-mal so hoch wie die Expression von *VWCE* in der unbestrahlten Kontrolle (siehe Abb. 22, e). Weitaus geringere relative Expressionen wurden für *DOK7* detektiert, wobei dennoch ein kontinuierlicher Expressionsanstieg mit steigender Dosis besonders 24 h nach Bestrahlung beobachtet werden konnte (siehe Abb. 22, f). Die durchweg niedrigsten Expressionen wies *LGR6* auf. Dabei konnte ein geringer Expressionsanstieg von *LGR6* 24 h nach Bestrahlung detektiert werden, der nach einer Bestrahlung mit 4 Gy im Vergleich zur Kontrolle um das 1,5-fache erhöht war (siehe Abb. 22, g).

Insgesamt wurden durch die qRT-PCR-Messungen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung für sechs der sieben Gene, ausgenommen *LGR6*, deutliche Expressionsunterschiede im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle belegt. Zudem wurden besonders für *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3* und *VWCE* signifikante Expressionssteigerungen von der niedrigeren zur nächst höheren Strahlendosis beobachtet.



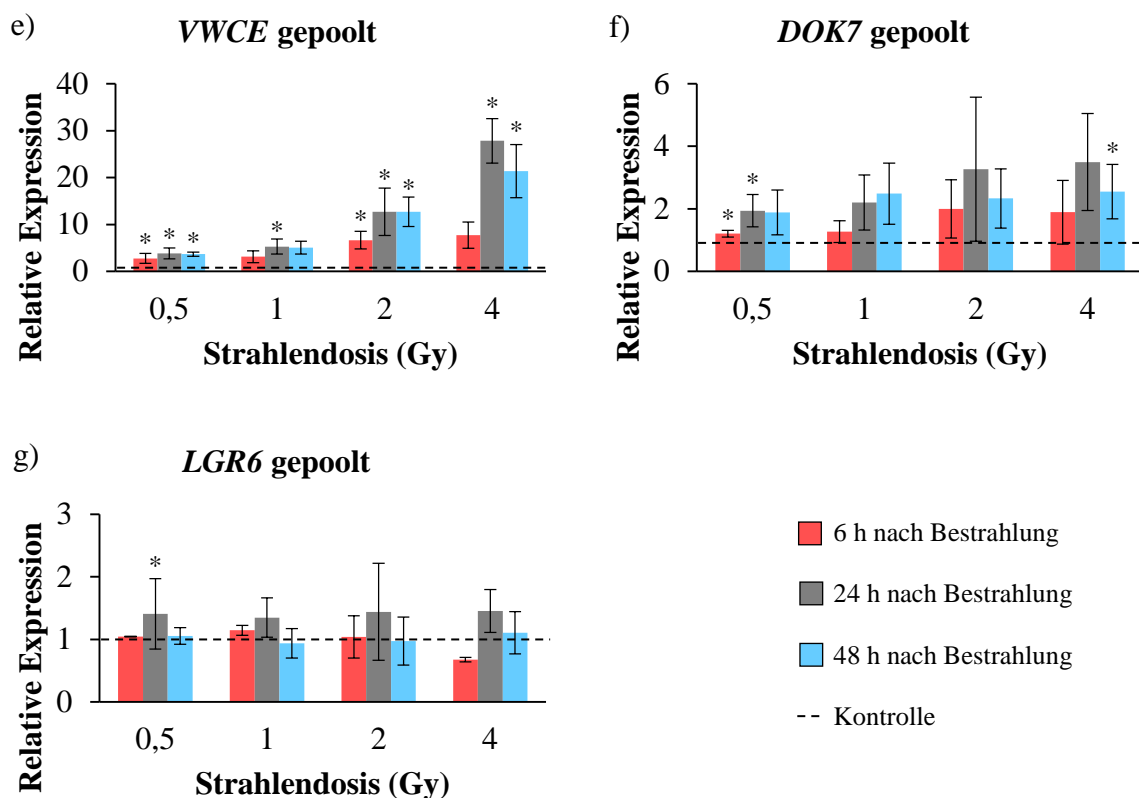


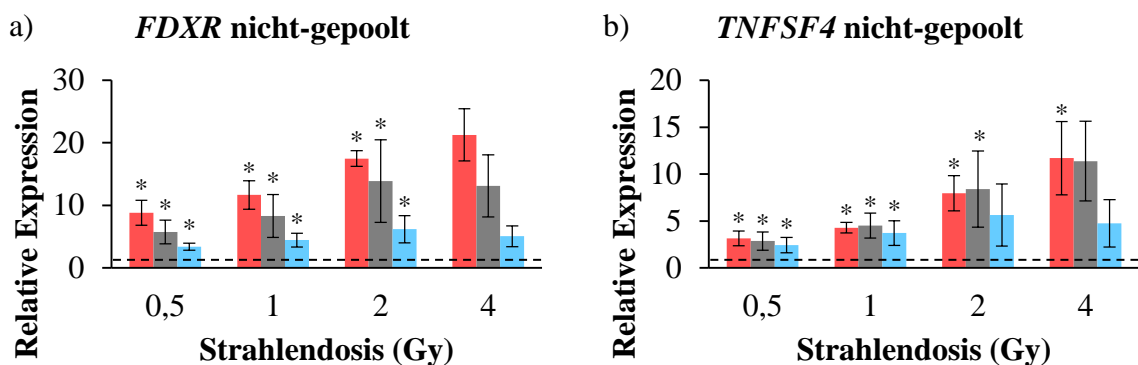
Abb. 22: Relative Genexpressionen von Markergenen für die Biodosimetrie in gepoolten RNA-Proben. Die qRT-PCR Untersuchungen zeigten für *FDXR* (a) und *PHLDA3* (c) starke Hochregulationen 6 h nach Bestrahlung, wohingegen für *TNFSF4* (b) und *SPATA18* (d) die stärkste Hochregulation 24 h nach Bestrahlung gemessen wurde. *VWCE* (e) wies die größten Expressionsänderungen auf und die geringsten Expressionsänderungen wurden für *DOK7* (f) und *LGR6* (g) detektiert. (Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Messungen von gepoolten RNA-Proben von sechs Spendern; *p < 0,05 von der niedrigeren zur nächst höheren Strahlendosis.)

3.2.2 Charakterisierung der individuellen Expressionen

Die interindividuellen Genexpressionsunterschiede von *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18*, *VWCE*, *DOK7* und *LGR6* wurden untersucht, indem nicht-gepoolte RNA-Proben von sechs Spendern in qRT-PCR-Messungen eingesetzt wurden (siehe 2.2.3.4). Dazu wurde Vollblut von drei Spendern des initialen Donorpools für die Generierung der *Microarrays* und Vollblut von drei zusätzlichen Spendern (siehe 2.2.3.4; Tab. 4) mit 0,5, 1, 2 und 4 Gy bestrahlt (siehe 2.2.1.1) und die RNA 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung isoliert (siehe 2.2.3.1). Aus den Expressionsdiagrammen der einzelnen Gene ging hervor, dass *FDXR* 6 h nach Bestrahlung mit zunehmender Strahlendosis einen signifikanten Expressionsanstieg aufwies, der sein Maximum nach einer 4 Gy Bestrahlung erreichte und dabei 21-mal so hoch wie die Expression von *FDXR* in der Kontrolle war (siehe Abb. 23, a). Für *TNFSF4* hingegen wurden sehr ähnliche Expressionswerte 6 und 24 h nach Bestrahlungen mit den vier verschiedenen

Dosen detektiert, die mit steigender Strahlendosis zunahmen (siehe Abb. 23, b). Auch für *PHLDA3* wurden bei den nicht-gepoolten Proben 6 und 24 h nach Bestrahlung sehr ähnliche Expressionen aufgezeigt, die aber deutlich über den für *TNFSF4* gemessenen Werten lagen. Dabei waren die Expressionen von *PHLDA3* 6 h nach einer 4 Gy Bestrahlung 16,7-mal und 24 h nach einer 4 Gy Bestrahlung 14,3-mal so hoch wie die Expression des Gens in der unbestrahlten Kontrolle (siehe Abb. 23, c). Für *SPATA18* hingegen wurden zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung mit den vier verschiedenen Dosen sehr ähnliche Expressionswerte gemessen. Lediglich nach einer Bestrahlung mit 4 Gy wiesen die Expressionswerte größere Unterschiede auf, wobei die 24 h nach Bestrahlung isolierten RNA-Proben die höchste Expression von *SPATA18* zeigten (siehe Abb. 23, d). *VWCE* wies zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung einen zur Strahlendosis proportionalen Anstieg der Genexpression auf, der jedoch 6 h nach Bestrahlung am deutlichsten war und nach einer 4 Gy Bestrahlung mit einer relativen Expression von 12,9 den maximalen Wert erreichte (siehe Abb. 23, e). Auch für *DOK7* wurden zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung Expressionen detektiert, die mit steigender Strahlendosis zunahmen (siehe Abb. 23, f). Für *LGR6* hingegen konnten keine signifikanten Expressionsänderungen belegt werden. 24 h nach einer 2 und 4 Gy Bestrahlung wurden jedoch Expressionen detektiert, die mehr als doppelt so hoch waren wie die Expressionen von *LGR6* in den Kontrollproben (siehe Abb. 23, g).

Insgesamt konnten für sechs Markergene nach Bestrahlung signifikante Expressionsanstiege in den nicht-gepoolten Proben der sechs Spender nachgewiesen werden. Dabei wurden besonders für *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18* und *VWCE* sehr deutliche Anstiege der Expression im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle detektiert.



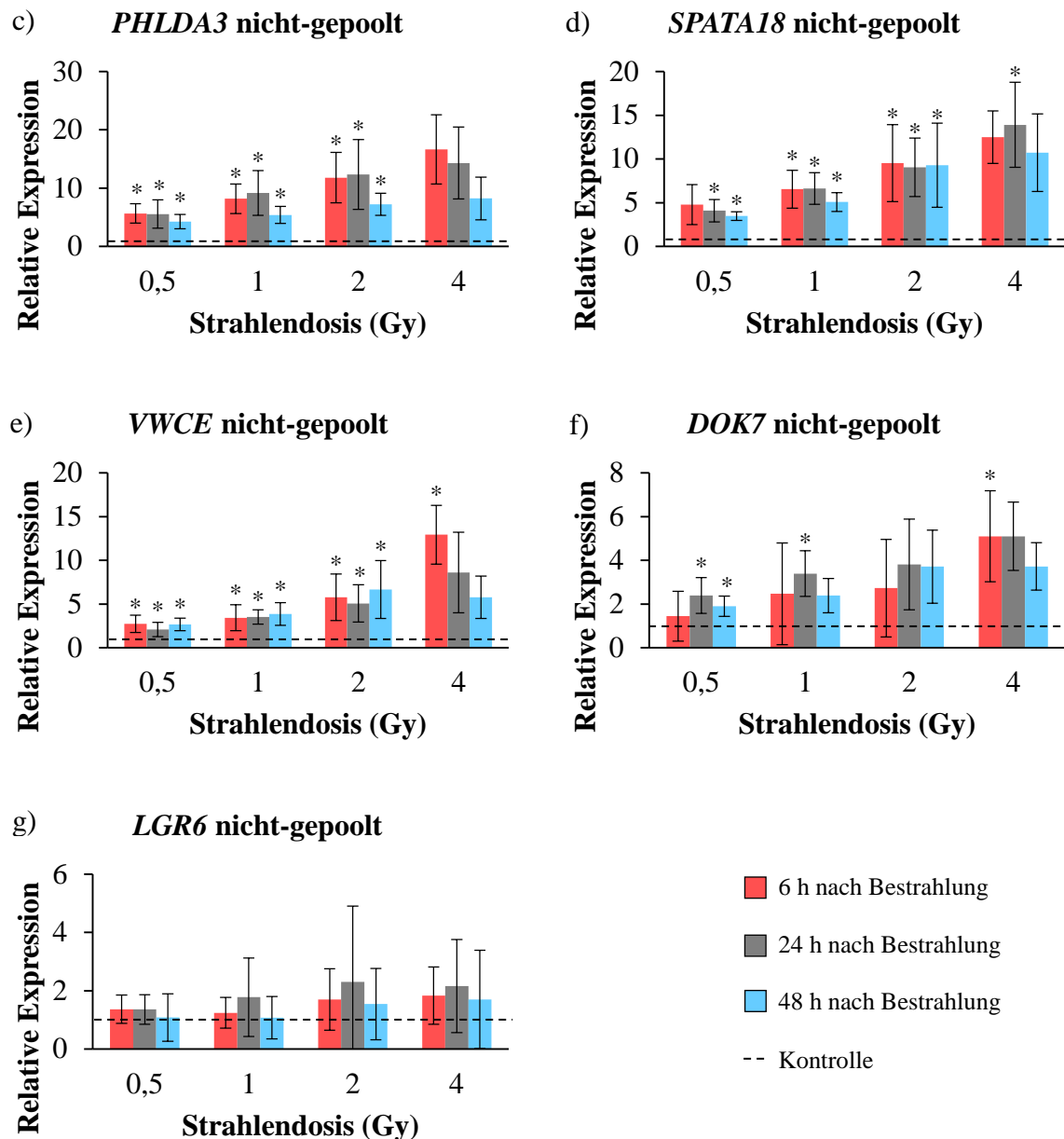


Abb. 23: Relative Genexpressionen von Markergenen für die Biodosimetrie in nicht-gepoolten Proben. Um die interindividuellen Expressionsunterschiede der Markergene zu untersuchen, wurden qRT-PCR-Messungen an nicht-gepoolten RNA-Proben von sechs Spendern durchgeführt. Für *FDXR* (a), *PHLDA3* (c) und *VWCE* (e) wurden besonders 6 h nach Bestrahlung hohe Expressionswerte detektiert. *TNFSF4* (b) und *SPATA18* (d) wiesen 6 und 24 h nach Bestrahlung ähnliche Expressionswerte auf. Für *DOK7* (f) wurde 24 h nach Bestrahlung mit steigenden Strahlendosen ein kontinuierlicher Expressionsanstieg detektiert. (Die Standardabweichung resultiert aus den qRT-PCR-Messungen von RNA-Proben von sechs Spendern; * $p < 0,05$ von der niedrigeren zur nächst höheren Strahlendosis.)

3.2.3 Vergleich der *Microarray*- und qRT-PCR-Expressionsdaten

Die Generierung der *Microarrays*, die für Signalweganalysen und für die Identifizierung von Genen für Dosisabschätzungen nach Hochdosisbestrahlung vorbereitet wurden (siehe 3.1.4; 3.1.5; 3.2), erfolgte unter Verwendung von gepoolten RNA-Proben von sechs gesunden

Spendern (siehe 2.2.3.2). Durch die Auswertung der *Microarrays* wurden 16 Gene identifiziert, die für die Dosiszuordnung im untersuchten Zeitraum (6 - 48 h) und Dosisspektrum (0,5 - 4 Gy) geeignet waren (siehe 3.2). Die Validierung der *Microarray*-Ergebnisse erfolgte in qRT-PCR-Messungen (siehe 2.2.3.4) an gepoolten- (siehe 3.2.1.2) und nicht-gepoolten RNA-Proben von sechs Spendern (siehe 3.2.2).

Der Vergleich der Expressionsprofile von fünf robusten Markergenen, detektiert mittels *Microarrays* und in den gepoolten- und nicht-gepoolten RNA-Proben durch qRT-PCR-Messungen, erbrachte, dass für *TNFSF4* sehr ähnliche Expressionswerte 6, 24 und 48 h in allen bestrahlten Proben detektiert wurden (siehe Abb. 24). Die Expression des Gens stieg in allen untersuchten Proben besonders 6 und 24 h nach Bestrahlung mit steigender Strahlendosis an. Die für *FDXR* gemessenen Expressionswerte waren vor allem 6 h nach Bestrahlung in den *Microarrays* und den qRT-PCR-Messungen nahezu identisch, wohingegen 24 und 48 h nach Bestrahlung höhere Expressionswerte für *FDXR* in den *Microarrays* als in den qRT-PCR-Messungen detektiert wurden (siehe Abb. 24). Auch *SPATA18* und *PHLDA3* wiesen sehr ähnliche Expressionsprofile vor allem 6 h nach Bestrahlung auf. Für beide Gene wurden jedoch 24 und 48 h nach Bestrahlung etwas höher Expressionswerte in den *Microarrays* als in den gepoolten- und nicht-gepoolten RNA-Proben in den qRT-PCR-Messungen detektiert (siehe Abb. 24). Für *VWCE* wurden 24 und 48 h nach Bestrahlung fast gleiche Expressionswerte mittels *Microarrays* und qRT-PCR-Messungen der gepoolten Proben detektiert, wobei die Expression von *VWCE* in den nicht-gepoolten Proben etwas geringer ausfiel. 6 h nach Bestrahlung waren die in den gepoolten und nicht-gepoolten Proben durch qRT-PCR-Messungen ermittelten Expressionswerte für *VWCE* sehr ähnlich und etwas höher als die mittels der *Microarrays* detektierten Expressionswerte dieses Gens (siehe Abb. 24).

Insgesamt wurde durch den Vergleich deutlich, dass die fünf dargestellten Markergene sehr ähnliche Expressionsprofile in den *Microarrays* und den qRT-PCR-Messungen aufwiesen. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass die in den nicht-gepoolten RNA-Proben detektierten Expressionswerte vergleichbar zu den Expressionswerten der fünf Markergene waren, die in den gepoolten RNA-Proben mittels *Microarrays* und qRT-PCR-Messungen detektiert wurden.

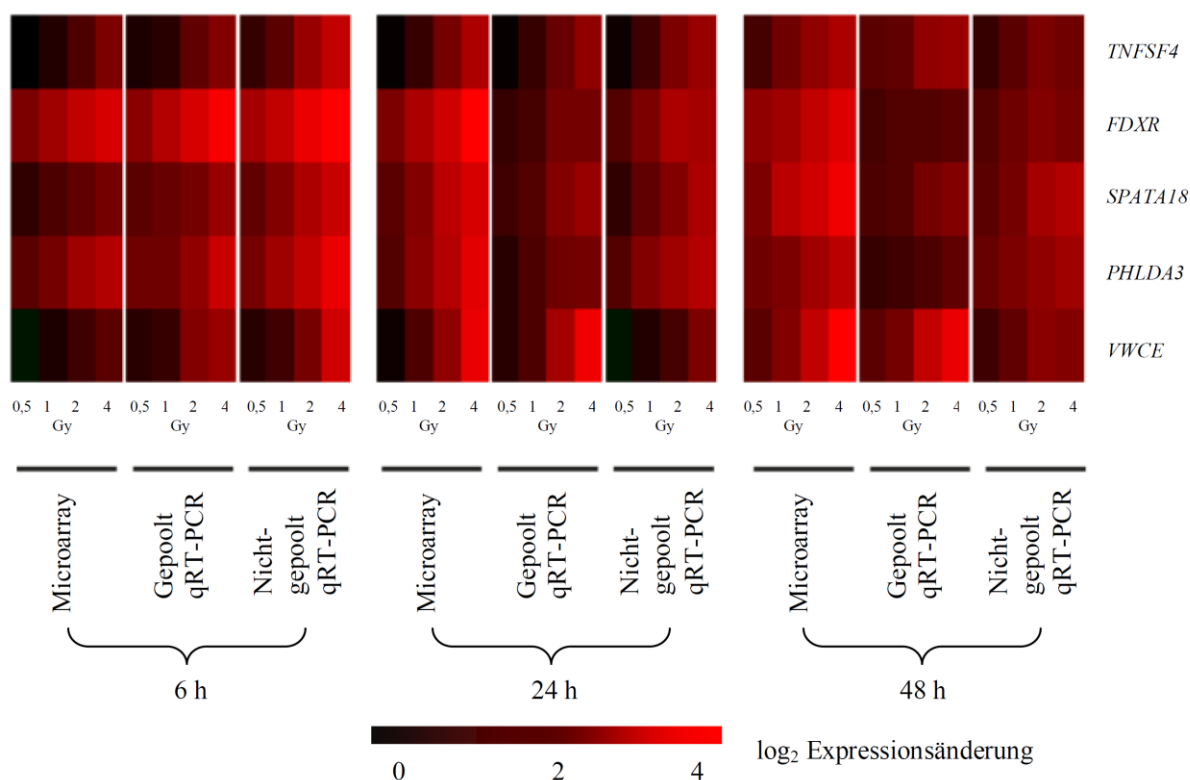


Abb. 24: Vergleich der Expressionsprofile von fünf Markergenen detektiert mittels *Microarrays* und in qRT-PCR-Messungen. Sowohl für die *Microarrays* als auch für einen Teil der qRT-PCR-Messungen wurden gepoolte Proben von sechs Spendern verwendet. Interindividuelle Expressionsunterschiede wurden an nicht-gepoolten Proben von sechs Spendern in qRT-PCR-Messungen untersucht. Insgesamt ließen sich dabei sehr ähnliche Expressionsprofile für alle Gene, insbesondere für *TNFSF4* und *SPATA18*, in den *Microarrays* und in den qRT-PCR-Messungen detektieren (modifiziert nach Boldt *et al.*, 2012).

3.2.4 Charakterisierung des Proteinstatus ausgewählter Genprodukte

Eine mögliche Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression nach Bestrahlung wurde an *FDXR* und *TNFSF4* untersucht, die Bestandteile des für die Dosiszuordnung nach Hochdosisbestrahlung identifizierten Gensets waren (siehe 3.2). Diese Gene wurden ausgewählt, da sie konstante Expressionsänderungen nach Bestrahlung sowohl in den *Microarray*-Experimenten als auch in den qRT-PCR-Messungen aufwiesen (siehe 3.2.1.2; 3.2.2). Für die Proteinquantifizierung wurden die lymphozytären Zelllysate zunächst über eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.5.4), anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.2.5.6) und dann mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein und als Referenz mit Antikörpern gegen GAPDH inkubiert. Anschließend wurden die relativen Expressionen der bestrahlten Proben im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle berechnet (siehe 2.2.5.8).

3.2.4.1 Proteinquantifizierung von TNFSF4 nach Hochdosisbestrahlung

Der immunologische Nachweis von TNFSF4 zeigte, dass 24 h nach einer Bestrahlung mit 2 und 4 Gy und 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,5, 1 und 2 Gy eine Steigerung der Proteinexpression von TNFSF4 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) nachweisbar war (siehe Abb. 25, b und c). 6 h nach Bestrahlung hingegen konnte keine Steigerung der Proteinexpression von TNFSF4 in den bestrahlten Proben im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle beobachtet werden (siehe Abb. 25, a).

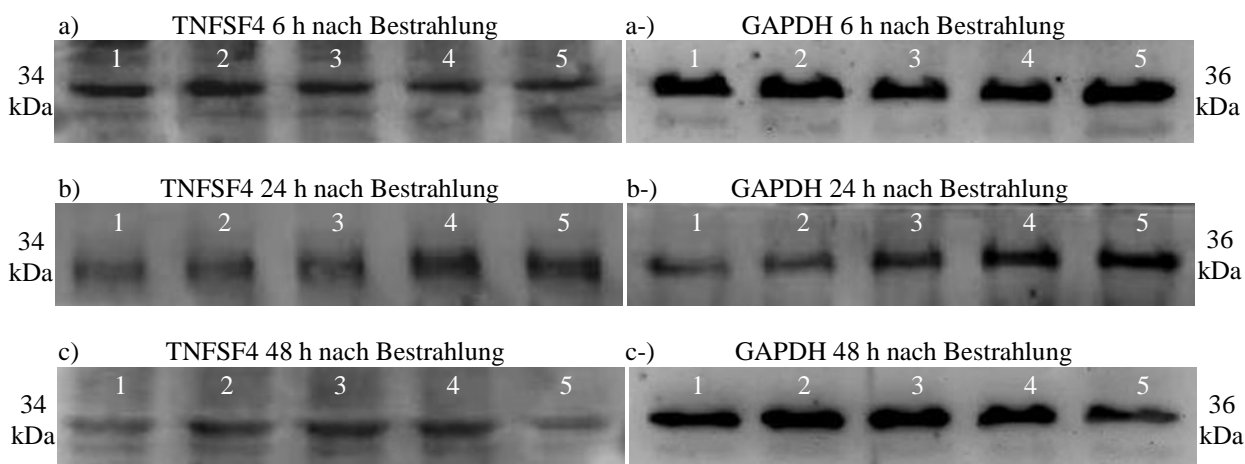


Abb. 25: Immunologischer Nachweis von TNFSF4 in Lymphozyten 6 (a), 24 (b) und 48 h (c) nach Bestrahlung (exemplarische Blots). Aufgetragen wurden 5 µg Zelllysate. Als Primärantikörper wurde ein polyclonaler TNFSF4 Antikörper und als Sekundärantikörper wurde ein *donkey anti-goat* Antikörper verwendet, an den die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. 1: Unbestrahlte Kontrolle (0 Gy); 2: 0,5 Gy bestrahlte Probe; 3: 1 Gy bestrahlte Probe; 4: 2 Gy bestrahlte Probe; 5: 4 Gy bestrahlte Probe. Als Ladekontrolle wurde außerdem zu allen drei untersuchten Zeitpunkten ein immunologischer Nachweis von GAPDH (a-, b-, c-) mitgeführt.

Aus den Berechnungen der relativen Proteinmenge der bestrahlten Proben im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, nach Normalisierung zur Expression des Referenzproteins GAPDH, wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Expression von TNFSF4 ermittelt (siehe Tab. 11). Dabei zeigte sich, dass 6 h nach Bestrahlung die Proteinexpression von TNFSF4 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nur sehr gering anstieg. 24 h nach Bestrahlung waren die Mittelwerte für die mit 2 und 4 Gy bestrahlten Proben im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle etwas erniedrigt. 48 h nach Bestrahlung wiesen die Mittelwerte der Expression von TNFSF4 für alle Strahlendosen einen deutlichen Expressionsanstieg des Proteins auf. Der Mittelwert der mit 2 Gy bestrahlten Proben war dabei am höchsten und wies eine 1,7-fache Steigerung der Expression von TNFSF4 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf. Jedoch wurden auch für die Expressionswerte 48 h nach Bestrahlung hohe Standardabweichungen errechnet, so dass keine signifikante Expressionssteigerung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle detektiert werden konnte.

Tab. 11: Proteinmengen von TNFSF4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (angegeben sind die relativen Proteinmengen von vier Spendern im Vergleich zur Kontrolle)

TNFSF4	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
6 h	1,2 ± 0,57	1,13 ± 0,56	1,24 ± 0,29	1,15 ± 0,35
24 h	1,13 ± 0,45	1,01 ± 0,72	0,72 ± 0,31	0,83 ± 0,31
48 h	1,42 ± 0,38	1,56 ± 0,69	1,73 ± 0,67	1,59 ± 0,8

3.2.4.2 Proteinquantifizierung von FDXR nach Hochdosisbestrahlung

Der immunologische Nachweis von FDXR wies zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung darauf hin, dass in den bestrahlten Proben (0,5 – 4 Gy) ein Anstieg der Proteinmenge von FDXR im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) vorlag (siehe Abb. 26, a, b, c). Besonders 48 h nach Bestrahlungen mit 1 und 2 Gy schien die Proteinmenge von FDXR verglichen mit der Expression von FDXR in der Kontrolle deutlich erhöht zu sein, wobei das Maximum an FDXR nach der 2 Gy Bestrahlung detektiert wurde (siehe Abb. 26, c).

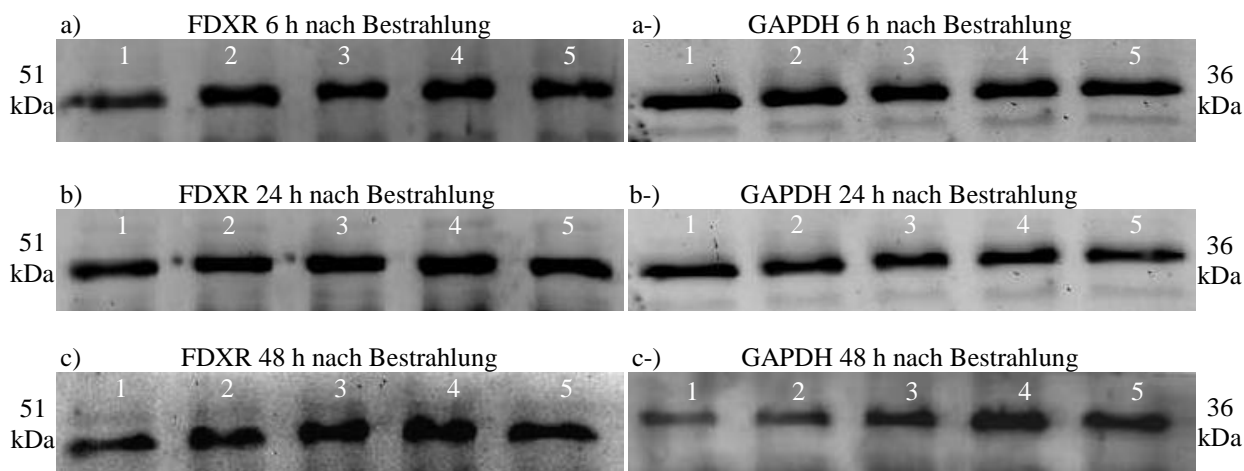


Abb. 26: Immunologischer Nachweis von FDXR in Lymphozyten 6 (a), 24 (b) und 48 h (c) nach Bestrahlung (exemplarische Blots). Aufgetragen wurden 5 µg Zelllysate. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler FDXR Antikörper und als Sekundärantikörper wurde ein *goat anti-rabbit* Antikörper verwendet, an den die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. 1: Unbestrahlte Kontrolle (0 Gy); 2: 0,5 Gy bestrahlte Probe; 3: 1 Gy bestrahlte Probe; 4: 2 Gy bestrahlte Probe; 5: 4 Gy bestrahlte Probe. Als Ladekontrolle wurde außerdem zu allen drei untersuchten Zeitpunkten ein immunologischer Nachweis von GAPDH (a-, b-, c-) mitgeführt.

Anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Proteinmenge unter Berücksichtigung des Referenzproteins GAPDH wurde ersichtlich, dass sowohl 6 als auch 24 h nach Bestrahlung mit den vier verschiedenen Strahlendosen, auch nach Bestrahlungen mit 2 und 4 Gy, keine signifikante Expressionssteigerung von FDXR im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle detektiert werden konnte (siehe Tab. 12). 48 h nach Bestrahlung

hingegen wurden Erhöhungen der Proteinmenge von FDXR gemessen, die bei einer Strahlendosis von 1 Gy signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht waren. Die mit 0,5, 2 und 4 Gy bestrahlten Proben wiesen jedoch auch 48 h nach Bestrahlung hohe Standardabweichungen auf und waren aufgrund dessen gegenüber der Kontrollprobe nicht signifikant erhöht.

Tab. 12: Proteinmengen von FDXR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (angegeben sind die relativen Proteinmengen von vier Spendern im Vergleich zur Kontrolle; * $p < 0,05$)

FDXR	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
6 h	1,19 ± 0,7	1,16 ± 0,59	1,37 ± 0,82	1,27 ± 0,75
24 h	1,11 ± 0,15	1,04 ± 0,24	1,19 ± 0,68	1,46 ± 0,84
48 h	1,4 ± 0,53	2,25* ± 1,01	1,58 ± 0,88	1,72 ± 1,4

Insgesamt wurde durch die Normalisierung der Expressionswerte von TNFSF4 und FDXR auf die Expression des Referenzproteins GAPDH und die sich anschließende Berechnung der relativen Proteinmenge im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle deutlich, dass nur für FDXR 48 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy ein signifikanter Expressionsanstieg belegt werden konnte. Die zudem detektierten Anstiege der Proteinexpression wiesen hohe Standardabweichungen auf und waren gegenüber der Kontrolle (0 Gy) nicht signifikant erhöht.

3.2.4.3 Proteinquantifizierung nach Translationshemmung

Die Genexpression von *FDXR* und *TNFSF4* stieg mit zunehmender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung an (siehe 3.2.1.2; 3.2.2), wohingegen die Proteinexpression von FDXR und TNFSF4 nach Bestrahlung nur gering zunahm (siehe 3.2.4.1; 3.2.4.2). Um zu überprüfen, ob der geringe Anstieg der Proteinexpression auf einen möglicherweise erhöhten Proteinabbau nach Bestrahlung zurückzuführen war, wurde die Translation in den Lymphozyten nach Bestrahlung gehemmt. Dazu wurde Vollblut von drei gesunden Spendern mit 1 und 4 Gy bestrahlt und eine unbestrahlte Probe (0 Gy) als Kontrolle verwendet. Anschließend wurden aus dem bestrahlten Vollblut und der Kontrolle die Lymphozyten isoliert und jede Probe mit dem Translationshemmer Cycloheximid inkubiert (siehe 2.2.5.2). Zur Kontrolle der Translationshemmung wurde außerdem von jeder Probe ein Aliquot ohne Cycloheximid kultiviert. 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung wurden lymphozytäre Ganzelllysate hergestellt (siehe 2.2.5.1), die für immunologische Nachweise von FDXR und GAPDH verwendet

wurden (siehe 2.2.5.4; 2.2.5.6). Anschließend wurden die relativen Expressionen der bestrahlten und mit Cycloheximid inkubierten Proben im Vergleich zur unbestrahlten und mit Cycloheximid inkubierten Kontrolle berechnet (siehe 2.2.5.8).

Aus den Blotbildern ging hervor, dass sowohl 6 als auch 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy ein deutlicher Anstieg der Proteinexpression von FDXR zu beobachten war (siehe Abb. 27, a und b, Bande 5). Zu diesen beiden Zeitpunkten nach Bestrahlung war die Hemmung der Translation durch die Inkubation mit Cycloheximid noch nicht deutlich sichtbar, wohingegen 48 h nach Bestrahlung und Beginn der Inkubation mit Cycloheximid eine deutliche Hemmung der Translation erkennbar war (siehe Abb. 27, c).

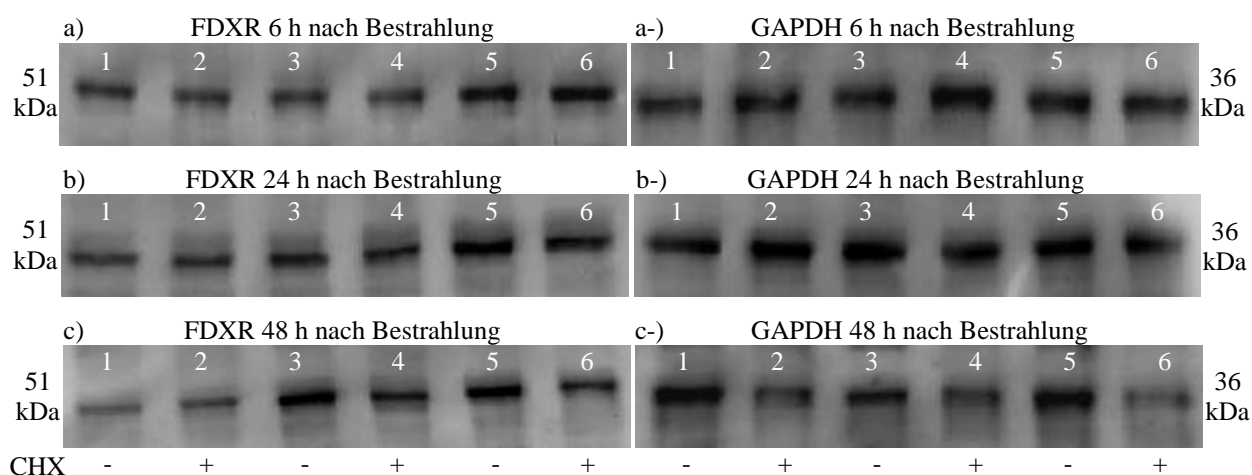


Abb. 27: Immunologischer Nachweis von FDXR in Lymphozyten 6 (a), 24 (b) und 48 h (c) nach Bestrahlung und Translationshemmung mit Cycloheximid (CHX; exemplarische Blots). Aufgetragen wurden 5 µg Zelllysate. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler FDXR Antikörper und als Sekundärantikörper wurde ein *goat anti-rabbit* Antikörper verwendet, an den die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. 1: Unbestrahlte Kontrolle (0 Gy); 2: Unbestrahlte Kontrolle mit CHX; 3: 1 Gy bestrahlte Probe; 4: 1 Gy bestrahlte Probe mit CHX; 5: 4 Gy bestrahlte Probe; 6: 4 Gy bestrahlte Probe mit CHX. Als Beladungskontrolle für die Gele wurde außerdem zu allen drei untersuchten Zeitpunkten immer ein immunologischer Nachweis von GAPDH mitgeführt (a-, b-, c-).

Anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Proteinmenge von FDXR unter Berücksichtigung des Referenzproteins GAPDH wurde schließlich ersichtlich, dass die Proteinmenge von FDXR in den bestrahlten und mit Cycloheximid inkubierten Proben gegenüber der Proteinmenge von FDXR in der bestrahlten und mit Cycloheximid inkubierten Kontrolle nicht signifikant erniedrigt war (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Proteinmengen von FDXR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation mit Cycloheximid (CHX; angegeben sind die relativen Proteinmengen von drei Spendern im Vergleich zur Kontrolle)

FDXR	1 Gy CHX	4 Gy CHX
6 h	0,94 ± 0,13	1,31 ± 0,31
24 h	1,15 ± 0,12	0,8 ± 0,3
48 h	1,2 ± 0,2	1,04 ± 0,19

3.2.5 Untersuchung der Strahlenspezifität der identifizierten Markergene

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Verwendung von *Microarrays* Genexpressionsanalysen von Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung durchgeführt, die unter anderem zu der Identifizierung von 16 Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung führten (3.2). Um die Strahlenspezifität der ausgewählten Markergene zu überprüfen, wurden humane Lymphozyten mit den DNA-schädigenden Substanzen 4-Acetamidophenol und Mitomycin C inkubiert.

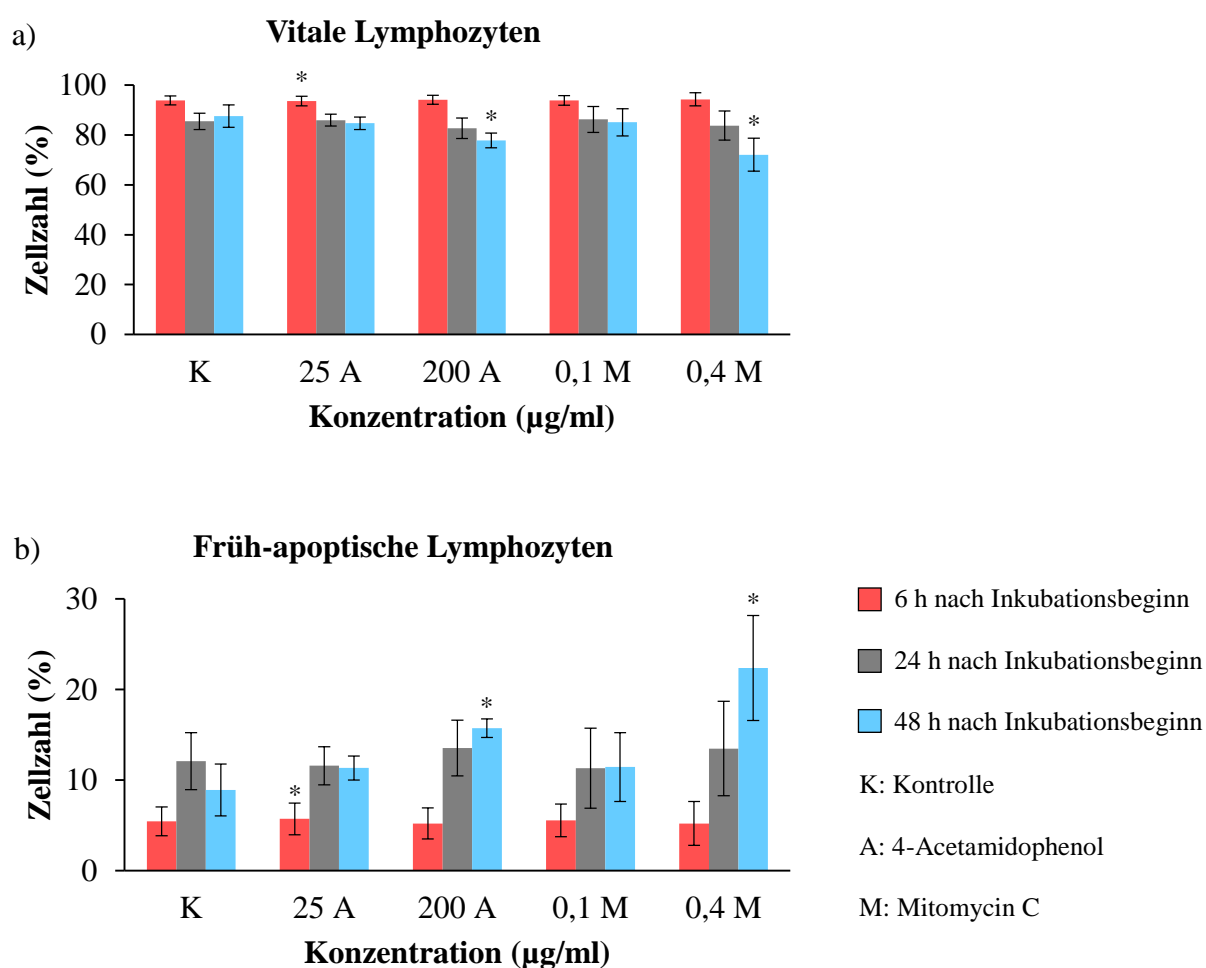
3.2.5.1 Bestimmung der Apoptoserate von Lymphozyten nach 4-Acetamidophenol- und Mitomycin C Inkubation

Die schädigende Wirkung von 4-Acetamidophenol und Mitomycin C auf Lymphozyten wurde untersucht, indem zunächst die Apoptoserate der Lymphozyten 6, 24 und 48 h nach Inkubationsbeginn mit 4-Acetamidophenol (25 und 200 µg/ml) und Mitomycin C (0,1 und 0,4 µg/ml) gemessen wurde. Dazu wurde das Annexin V-FITC Propidiumiodid-Assay angewandt und die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 2.2.5.9).

Die Anzahl an vitalen Lymphozyten nahm mit zunehmender Inkubationsdauer mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C deutlich ab (siehe Abb. 28, a). Dabei wurde für die mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol behandelten Lymphozyten 48 h nach Inkubationsbeginn ein signifikanter Abfall der vitalen Lymphozyten auf 77,8% gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen, wobei in der Kontrolle noch 87,6% vitale Lymphozyten enthalten waren. Auch für die mit 0,4 µg/ml Mitomycin C inkubierten Lymphozyten wurde 48 h nach Inkubationsbeginn eine signifikante Abnahme des Anteils an vitalen Lymphozyten auf 72,1% detektiert (siehe Abb. 28, a). Demgegenüber wurde ein signifikanter Anstieg der früh-apoptotischen Lymphozyten 48 h nach Inkubationsbeginn mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol

und 0,4 µg/ml Mitomycin C beobachtet (siehe Abb. 28, b). Der Anteil an früh-apoptotischen Lymphozyten lag dabei nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol bei 15,7% und nach Inkubation mit Mitomycin C bei 22,4%, wobei der Anteil der früh-apoptotischen Lymphozyten in der unbehandelten Kontrolle 48 h nach Kultivierungsbeginn 8,9% betrug. Auch für die spät-apoptotischen Lymphozyten wurde 48 h nach Inkubationsbeginn mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol und 0,4 µg/ml Mitomycin C ein signifikanter Anstieg detektiert (siehe Abb. 28, c). Der spät-apoptotische Anteil in den 4-Acetamidophenol behandelten Lymphozyten lag dabei bei 6,2% und in den mit Mitomycin C behandelten Lymphozyten bei 5,2%.

Insgesamt führte die Inkubation mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol und mit 0,4 µg/ml Mitomycin C 48 h nach Inkubationsbeginn zu einer signifikanten Abnahme an vitalen Lymphozyten. Des Weiteren wurde ein signifikant erhöhter Anteil an früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten nach Behandlung mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol und 0,4 µg/ml Mitomycin C 48 h nach Inkubationsbeginn detektiert.



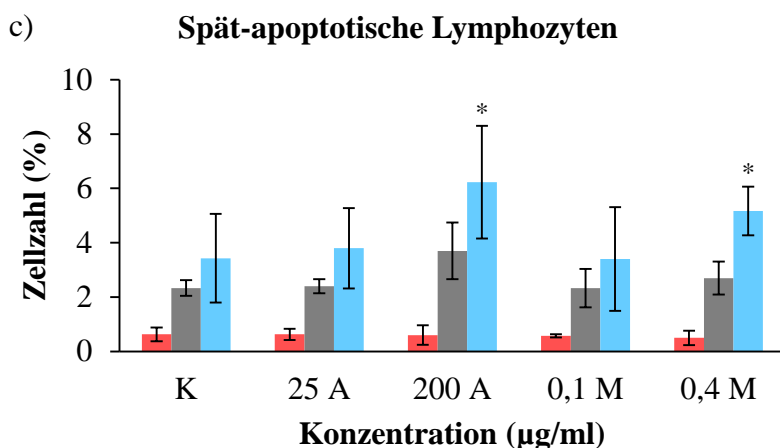


Abb. 28: Darstellung der vitalen-, früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol (A) und Mitomycin C (M). Insgesamt nahm die Anzahl der vitalen Lymphozyten 48 h nach Inkubation mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol und 0,4 µg/ml Mitomycin C signifikant gegenüber der Kontrolle ab (a). Der Anteil der früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten nahm 48 h nach Behandlung mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol und 0,4 µg/ml Mitomycin C signifikant zu (b und c). (Die Standardabweichung resultiert aus der Messung der Apoptoserate der Lymphozyten von drei verschiedenen Spendern; *p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.)

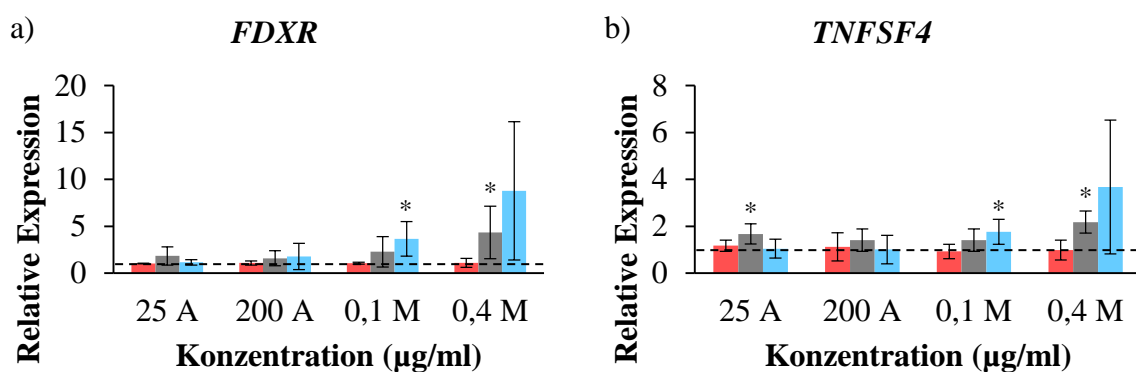
3.2.5.2 Expressionsanalysen nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation

Die Expressionen von sieben für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung identifizierten Markergenen, von *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18*, *VWCE*, *DOK7* und *LGR6* (siehe 3.2) wurden nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C bestimmt. Verwendet wurden dazu RNA-Proben von Lymphozyten, die mit 25 und 200 µg/ml 4-Acetamidophenol und mit 0,1 und 0,4 µg/ml Mitomycin C inkubiert wurden (siehe 2.2.1.2; 2.2.3.1). Die lymphozytäre RNA wurde dazu 6, 24 und 48 h nach Inkubationsbeginn isoliert und in qRT-PCR-Messungen eingesetzt (siehe 2.2.3.4).

Die Behandlung der Lymphozyten mit 25 und 200 µg/ml 4-Acetamidophenol führte 24 h nach Inkubationsbeginn bei *SPATA18*, *DOK7* und *LGR6* zu einer signifikanten Änderung der Genexpression (siehe Abb. 29, d, f, g). Die Expression von *SPATA18* in den mit 25 und mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol behandelten Proben war dabei etwa 2,5-mal so hoch wie die Expression des Gens in der unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 29, d). Höhere Genexpressionsanstiege wurden nach Inkubationen mit Mitomycin C gemessen. Dabei wurden für *FDXR*, *TNFSF4* und *PHLDA3* signifikante Anstiege der Expressionen 48 h nach Inkubationsbeginn mit 0,1 µg/ml Mitomycin C detektiert, wobei die Expression von *FDXR* 3,7-mal, die Expression von *TNFSF4* 1,8-mal und die Expression von *PHLDA3* 2,2-mal so hoch wie die Expression der Gene in der unbehandelten Kontrolle war (siehe Abb. 29, a, b, c).

Die insgesamt höchsten Anstiege der Genexpression wurden nach Inkubation mit 0,4 µg/ml Mitomycin C detektiert. 24 h nach Inkubationsbeginn wurden dabei signifikante Expressionssteigerungen für *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18* und *VWCE* gemessen, wobei *TNFSF4*, *SPATA18* und *VWCE* in den Mitomycin C behandelten Proben etwa 2,3-mal so stark exprimiert wurden wie in der Kontrolle (siehe Abb. 29, b, d, e). Die höchste Expression 24 h nach Inkubationsbeginn wurde für *FDXR* detektiert und war 4,3-mal so hoch wie die Expression von *FDXR* in der Kontrolle (siehe Abb. 29, a). Der Anstieg der Genexpression nach einer Behandlung mit 0,4 µg/ml Mitomycin C setzte sich 48 h nach Inkubationsbeginn für *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18* und *VWCE* fort (siehe Abb. 29, a, b, c, d, e). Für *VWCE* wurde die höchste Expression detektiert, die 14,2-mal höher als die Expression des Gens in der Kontrolle war (siehe Abb. 29, e), aber auch *FDXR* war gegenüber der Kontrolle um das 8,8-fache erhöht (siehe Abb. 29, a). Die anderen Gene wiesen Expressionssteigerungen auf, die zwischen dem 4- und 5-fachen der Expression dieser Gene in der Kontrolle lagen.

Zusammenfassend führte die Inkubation der Lymphozyten mit Mitomycin C, besonders 48 h nach Inkubationsbeginn mit 0,4 µg/ml Mitomycin C, zu deutlichen Expressionssteigerungen in fünf der sieben untersuchten Gene, also bei *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18* und *VWCE*. Die Inkubation mit 4-Acetamidophenol hingegen verursachte nur sehr geringe Anstiege der Genexpression.



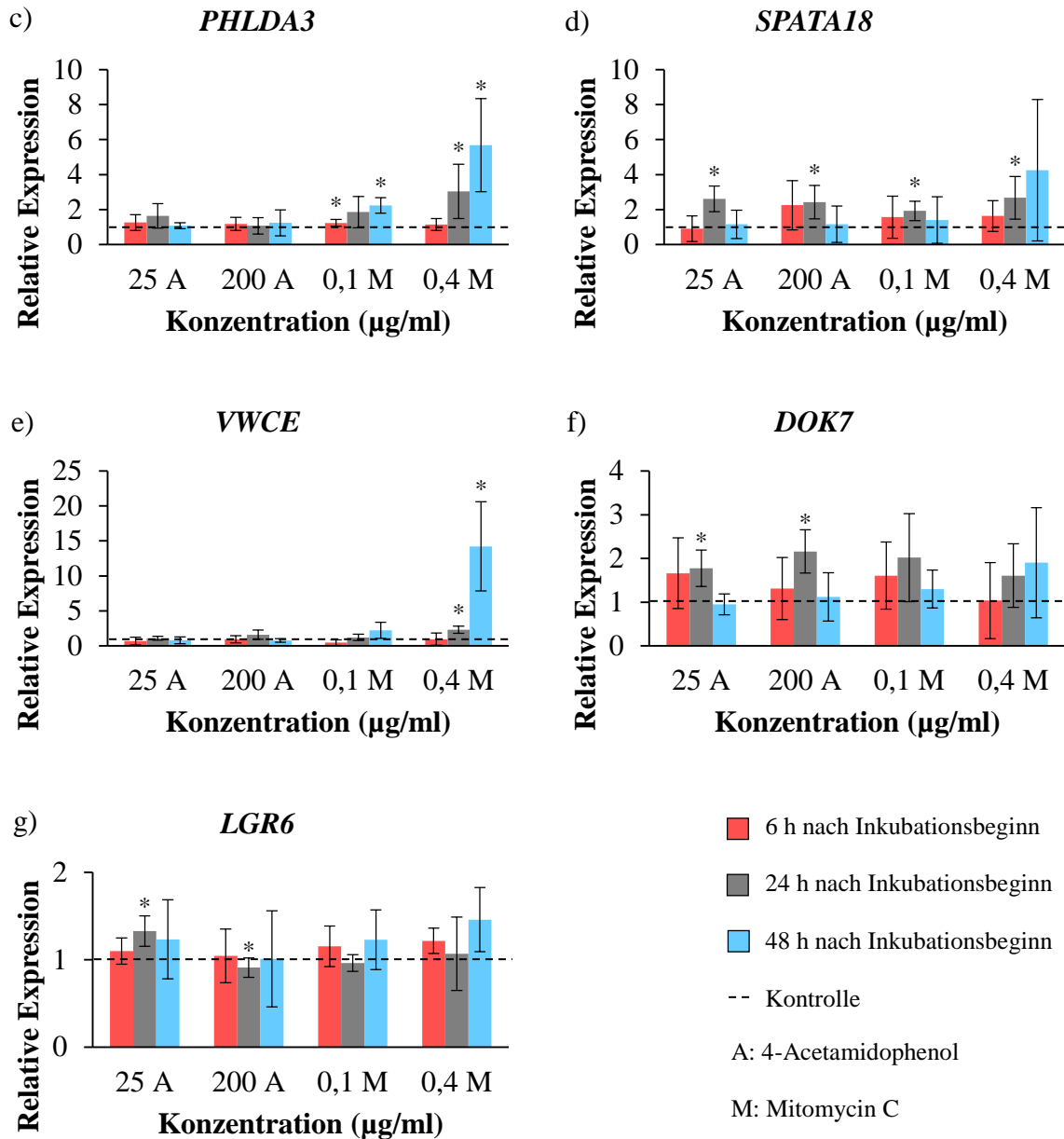


Abb. 29: Relative Genexpressionen nach 4-Acetamidophenol (A) und Mitomycin C (M) Exposition. Ein deutlicher Anstieg der Genexpression wurde für *FDXR* (a), *PHLDA3* (c) und *VWCE* (e) 48 h nach Inkubationsbeginn mit 0,4 µg/ml Mitomycin C detektiert. Ein geringerer Anstieg der Genexpression wurde hingegen für *TNFSF4* (b) und *SPATA18* (d) 48 h nach Inkubationsbeginn mit 0,4 µg/ml Mitomycin C gemessen. Die Inkubation mit 4-Acetamidophenol führte zu keinem deutlichen Anstieg der Genexpression in den untersuchten Genen. (Die Standardabweichung resultiert aus den qRT-PCR-Messungen der RNA-Proben von vier Spendern; *p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.)

3.3 Charakterisierung der biologischen Wirkung von Niedrigdosisbestrahlung auf Lymphozyten

Neben der Hochdosisbestrahlung wurden in dieser Arbeit auch die durch Niedrigdosisbestrahlung induzierten Änderungen der Genexpression in Lymphozyten untersucht. Dazu wurden auf *Microarrays* basierende Genexpressionsanalysen mit niedrigen Dosen bestrahlter Lymphozyten durchgeführt. Die mittels der *Microarrays* generierten Expressionsdaten wurden schließlich dahingehend ausgewertet, auch für den Niedrigdosisbereich Markergene zu identifizieren, die für Dosisabschätzungen nach Niedrigdosisbestrahlung geeignet waren.

3.3.1 Bestimmung der Apoptoserate von Lymphozyten nach Niedrigdosisbestrahlung

Die Wirkung einer Niedrigdosisbestrahlung auf die Apoptoserate von Lymphozyten wurde untersucht, indem das Vollblut von sechs gesunden Spendern mit 0,02 und 0,1 Gy bestrahlt und eine unbestrahlte Probe als Kontrolle verwendet wurde (siehe 2.2.1.1). Anschließend wurden die Lymphozyten aus dem Vollblut isoliert (siehe 2.2.2.1) und 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung die Apoptoserate der Lymphozyten mittels des Annexin V-FITC Propidiumiodid-Assays durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 2.2.5.9).

Der Anteil an vitalen Lymphozyten nahm dabei sowohl in der Kontrolle als auch in den bestrahlten Proben mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung ab (siehe Abb. 30, a). Eine signifikante Abnahme der vitalen Lymphozyten war 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,02 Gy und 24 und 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zu beobachten. Dabei sank der Anteil der vitalen Lymphozyten nach 48 h von 81,9% in der Kontrolle auf 78,5% nach einer 0,02 Gy Bestrahlung und auf 77,7% nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy (siehe Abb. 30, a). Der Anteil an früh-apoptotischen Lymphozyten hingegen stieg mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung an, wobei ein deutlicher Anstieg der früh-apoptotischen Lymphozyten nach 48 h detektiert wurde (siehe Abb. 30, b). Der Anteil an früh-apoptotischen Lymphozyten stieg dabei von 12,6% in der Kontrolle auf 14,8% in den mit 0,02 Gy bestrahlten und auf 15,8% in den mit 0,1 Gy bestrahlten Proben an. Ein signifikanter Anstieg an spät-apoptotischen Lymphozyten wurde für 0,02 Gy bestrahlte Proben 48 h nach Bestrahlung und für 0,1 Gy bestrahlte Proben 24 und 48 h nach Bestrahlung detektiert (siehe Abb. 30, c).

Insgesamt war eine Bestrahlung mit 0,02 Gy ausreichend, um den Anteil an vitalen-, früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten 48 h nach Bestrahlung signifikant zu erniedrigen bzw. zu erhöhen. Eine Bestrahlung mit 0,1 Gy führte dazu, dass sowohl 24 als auch 48 h nach Bestrahlung der Anteil vitaler Lymphozyten signifikant sank und der Anteil an früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten signifikant anstieg.

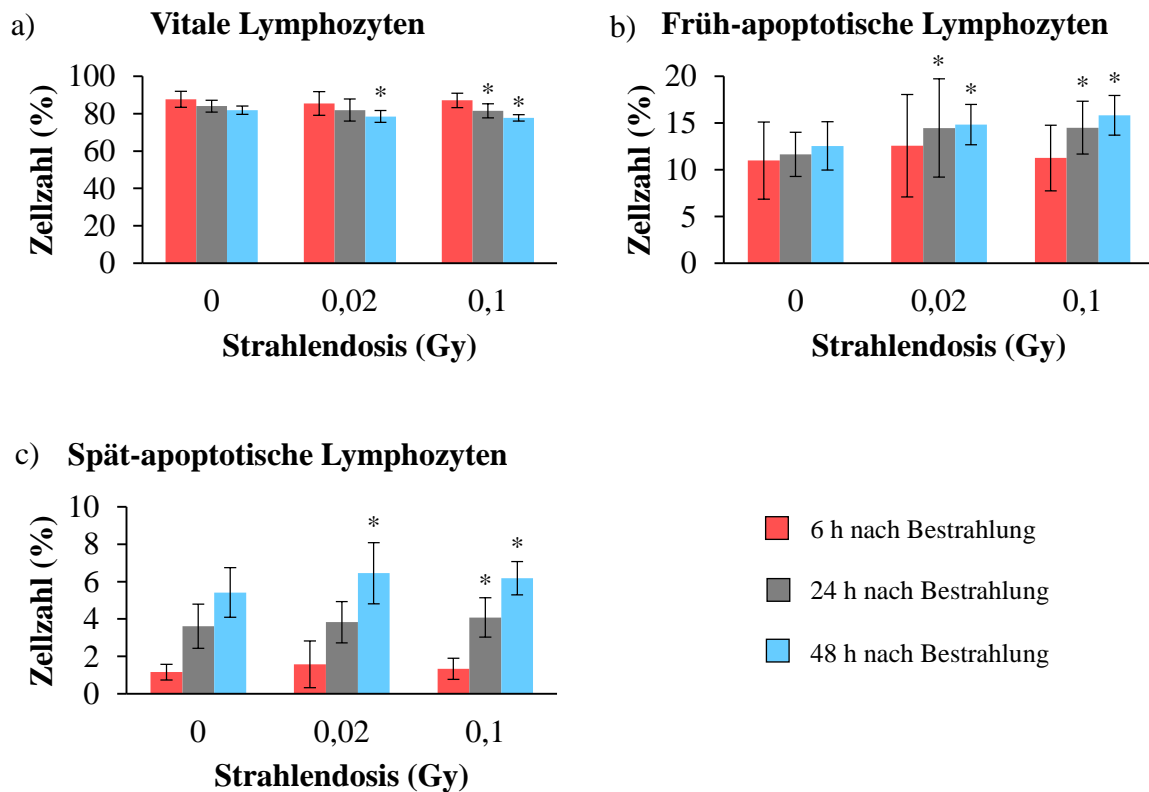


Abb. 30: Darstellung vitaler-, früh- und spät-apoptotischer Lymphozyten nach Niedrigdosisbestrahlung. Insgesamt sank der Anteil der vitalen Lymphozyten 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,02 Gy und 24 und 48 h nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy signifikant gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (a). 24 und 48 h nach Bestrahlungen mit 0,02 und 0,1 Gy nahm die Anzahl der früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten signifikant zu (b und c). (Die Standardabweichung resultiert aus Apoptosemessungen von Lymphozyten von sechs verschiedenen Spendern; *p < 0,05 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.)

3.3.2 Identifizierung von Markergenen für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung

Die Auswahl von Genen, die für eine Dosiszuordnung im Niedrigdosisbereich geeignet sind, erfolgte durch die Auswertung von 18 *Microarrays*, basierend auf zwei Strahlendosen (0,02, 0,1 Gy) und der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy), zwei Zeitpunkten (24, 48 h) und drei Replikaten. Die Auswertung der *Microarrays* im Niedrigdosisbereich erfolgte mittels einer 6-fachen Kreuzvalidierung, wobei 600 Genlisten generiert wurden. Aus jeder der 600 Genlisten

wurden anschließend die 20 Gene mit dem höchsten Expressionsunterschied zwischen 0,02 und 0,1 Gy selektiert, so dass wiederum 600 neue, aus jeweils 20 Genen bestehende, Genlisten generiert wurden. Für die Dosiszuordnung wurden letztlich die Gene ausgewählt, die in mindestens 500 der 600 Genlisten vorhanden waren (siehe 2.2.6.4).

Hierbei konnten neun Markergene identifiziert werden (siehe Tab. 14), von denen vier Gene in jeder der 600 Genlisten für die Selektion der Markergene vorhanden waren, da diese den größten Expressionsunterschied zwischen 0,02 und 0,1 Gy aufwiesen. Diese Gene waren *THC2535753*, *MKL2*, *FDXR* und *C10orf39*. *PFKFB3* wurde in 599, das bislang unbekannte Gen *A_32_P138939* in 581, *FLJ35379* in 544, *BU561469* in 541 und *LY6G5C* in 532 der 600 für die Selektion der Markergene generierten Genlisten detektiert (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Markergene für Dosiszuordnungen nach Niedrigdosisbestrahlung basierend auf der Selektionshäufigkeit (modifiziert nach Knops *et al.*, 2012; rot markierte Gene wurde in weitere Experimente eingesetzt)

Genname	Anzahl der Detektionen
<i>THC2535753</i>	600
<i>MKL2</i>	600
<i>FDXR</i>	600
<i>C10orf39</i>	600
<i>PFKFB3</i>	599
<i>A_32_P138939</i>	581
<i>FLJ35379</i>	544
<i>BU561469</i>	541
<i>LY6G5C</i>	532

Nach der Identifizierung der neun Markergene wurde geprüft, ob diese für Dosiszuordnungen zwischen 0 und 0,1 Gy geeignet sind. Dazu wurde eine *k-Nearest-Neighbour* Klassifikation mit den neun aufgelisteten Markergenen durchgeführt (siehe 2.2.6.4).

Insgesamt wurden die unbestrahlten Kontrollproben (0 Gy) und die mit 0,1 Gy bestrahlten Proben mit einer Sensitivität von 100% der korrekten Strahlendosis zugewiesen (siehe Tab. 15). Für die mit 0,02 Gy bestrahlten Proben hingegen ergab sich bei der Berechnung der Sensitivität ein etwas geringerer Wert von 86,7% (siehe Tab. 15). Die Spezifität hingegen erreichte für die unbestrahlten Proben (0 Gy) und für die mit 0,02 Gy bestrahlten Proben eine Genauigkeit von 100%, wohingegen die Spezifität für die mit 0,1 Gy bestrahlten Proben bei 93,3% lag (siehe Tab. 15).

Insgesamt konnte nach der *k-Nearest-Neighbour* Klassifikation (siehe 2.2.6.4) mit den neun potentiellen Markergenen eine durchschnittliche Sensitivität der Dosiszuordnung von 95,6% und eine durchschnittliche Spezifität der Dosiszuordnung von 97,8% ermittelt werden (siehe Tab. 15).

Tab. 15: Sensitivität und Spezifität der Dosisabschätzung im Niedrigdosisbereich (modifiziert nach Knops *et al.*, 2012)

Dosis (Gy)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0	100	100
0,02	86,7	100
0,1	100	93,3
Durchschnitt	95,6	97,8

3.3.3 Validierung der *Microarray*-Ergebnisse nach Niedrigdosisbestrahlung

Nach der Identifizierung von neun Markergenen für die Dosiszuordnung im Niedrigdosisbereich (siehe 3.3.2) wurden drei der Gene, *FDXR*, *LY6G5C* und *PFKFB3*, für die Validierung der *Microarray*-Ergebnisse ausgewählt. Des Weiteren wurden anhand dieser Gene die interindividuellen Genexpressionsunterschiede untersucht. Dazu wurde das Blut von vier gesunden Spendern mit 0,02 und 0,1 Gy bestrahlt (siehe 2.2.1.1) und die Lymphozyten isoliert (siehe 2.2.2.1). 24 und 48 h nach Bestrahlung wurde dann die lymphozytäre RNA extrahiert (siehe 2.2.3.1) und für qRT-PCR-Messungen verwendet (siehe 2.2.3.4).

Für *FDXR* wurde ein Anstieg der Genexpression 24 h nach Bestrahlung mit 0,02 und 0,1 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle detektiert, wobei die Expression von *FDXR* 24 h nach einer Bestrahlung mit 0,02 Gy 1,2-mal und nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy 1,6-mal höher war als in der Kontrolle (siehe Abb. 31, a). 48 h nach Bestrahlung hingegen sank die Expression von *FDXR* in den mit 0,02 Gy bestrahlten Proben unter die Expression von *FDXR* in der Kontrolle, wohingegen die mit 0,1 Gy bestrahlten Proben *FDXR* noch 1,1-mal so stark exprimierten wie die Kontrolle (siehe Abb. 31, a). Für *LY6G5C* wurde nur in den mit 0,02 Gy bestrahlten Proben 24 h nach Bestrahlung eine erhöhte Genexpression gegenüber der Kontrolle nachgewiesen, die 1,2-mal so hoch wie die Expression des Gens in der Kontrolle war (siehe Abb. 31, b). Eine Abnahme der Expression hingegen wurde für *PFKFB3* 24 und 48 h nach Bestrahlung gemessen (siehe Abb. 31, c). 24 h nach einer Bestrahlung mit 0,02 Gy sank die Expression von *PFKFB3* dabei auf das 0,7-fache und 48 h nach Bestrahlung auf das

0,5-fache der Kontrolle. Die Bestrahlung mit 0,1 Gy führte sowohl 24 als auch 48 h zu einer Halbierung der Expression von *PFKFB3* gegenüber der Expression des Gens in der unbestrahlten Kontrolle (siehe Abb. 31, c).

Zusammenfassend konnten mittels qRT-PCR-Messungen für alle drei untersuchten Gene Änderungen in der Genexpression nach Niedrigdosisbestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle aufgezeigt werden. Die deutlichsten Genexpressionsänderungen zeigten dabei *FDXR* und *PFKFB3*.

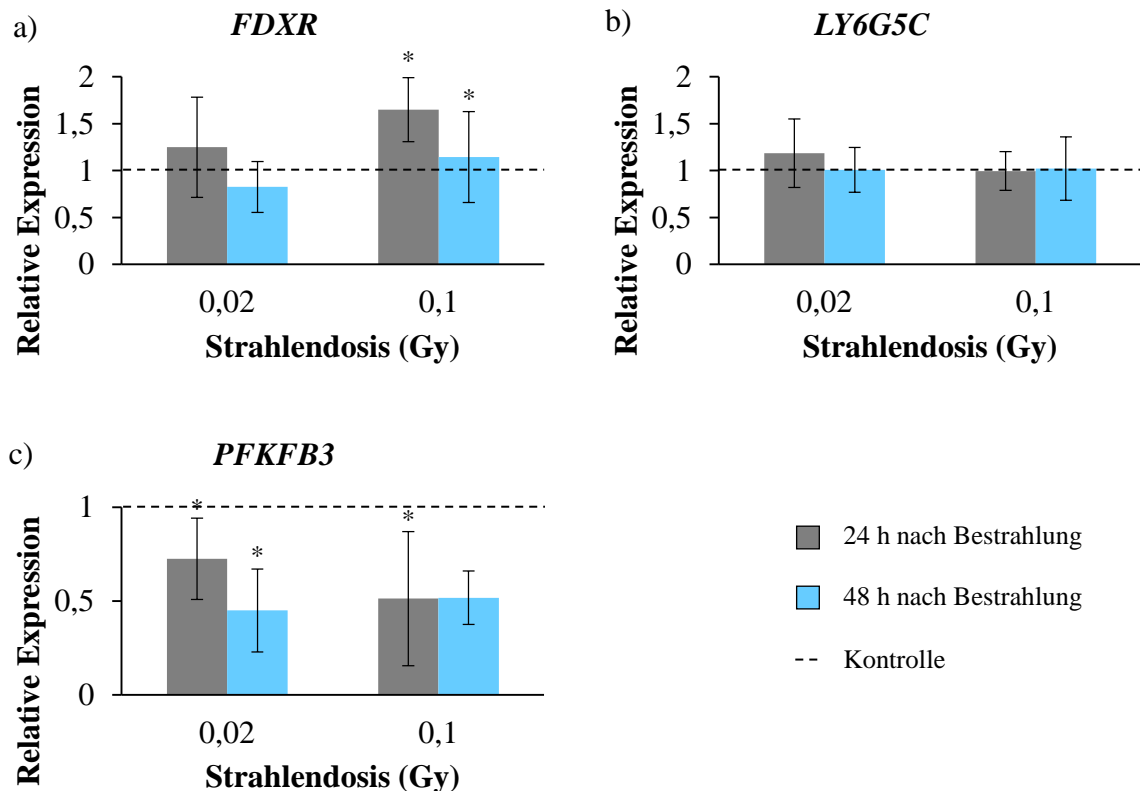


Abb. 31: Relative Expressionen von *FDXR*, *LY6G5C* und *PFKFB3* nach Niedrigdosisbestrahlung. Diese Gene wurden ausgewählt, um die mittels der *Microarrays* identifizierten Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung mittels qRT-PCR zu validieren. Für *FDXR* (a) wurde 24 h nach Bestrahlung mit 0,02 und 0,1 Gy eine deutliche Hochregulation im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle detektiert. *PFKFB3* (c) war in den bestrahlten Proben im Vergleich zur Kontrolle etwa um die Hälfte runterreguliert (modifiziert nach Knops *et al.*, 2012; die Standardabweichung resultiert aus der Messungen von RNA-Proben von vier Spendern; * $p < 0,05$ von der niedrigeren zur nächst höheren Dosis.)

4 Diskussion

Da bei großen radiologischen Unfällen viele Personen betroffen sind, die keine physikalischen Dosimeter tragen, bedarf es geeigneter Biomarker, die für die Abschätzung individueller Strahlendosen verwendet werden können. Um auf dieser Basis Strahlenrisiken besser abschätzen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit humane periphere Blutlymphozyten aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit gewählt, um an diesen auf der Grundlage von Genexpressionsänderungen die Auswirkungen IR auf die Zelle zu untersuchen und zudem Markergene zu identifizieren, die für Dosisabschätzungen exponierter Personen geeignet sind.

4.1 Zelluläre und molekulare Effekte der Hochdosisbestrahlung in Lymphozyten

4.1.1 Apoptoserate nach Hochdosisbestrahlung

Humane periphere Blutlymphozyten wurden zunächst mit dem Ziel untersucht, die Apoptoserate nach Hochdosisbestrahlung zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass der Anteil an vitalen Lymphozyten mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung und steigender Strahlendosis abnahm, wohingegen der Anteil an früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung und steigender Strahlendosis zunahm (siehe 3.1.1).

Obwohl die Apoptose bei kultivierten Lymphozyten auch spontan auftritt, wird die Anzahl der apoptotischen Lymphozyten durch die Einwirkung IR verstärkt (Erasmus *et al.*, 2005). Erasmus *et al.* (2005) detektierten mittels durchflusszytometrischer Messungen 48 h nach *in vitro* Bestrahlung von menschlichem Vollblut mit 2 und 8 Gy einen deutlichen Anstieg der strahleninduzierten Apoptose in CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen. Dabei wurde 48 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy im Vergleich zur Kontrolle eine durchschnittliche Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen um ca. 8% für die CD4⁺ T-Zellen und um ca. 11,8% für die CD8⁺ T-Zellen beobachtet. Der von Erasmus *et al.* (2005) gemessene Anteil an apoptotischen Zellen war dabei geringer als der in der vorliegenden Arbeit 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy detektierte Anteil an apoptotischen Lymphozyten. Dies kann jedoch darauf zurückgeführt werden, dass in dieser Arbeit keine Auftrennung der lymphozytären Subpopulationen erfolgte, so dass auch die Apoptoserate der B-Lymphozyten, welche die strahlensensitivste Subpopulation der Lymphozyten darstellen (Dehos *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 2003), durchflusszytometrisch bestimmt wurde.

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen Apoptoserate und Strahlendosis detektiert, was auch von Dainiak (2002) nach unfallbedingter *in vivo* Bestrahlung von Personen durch die Abnahme der im Blut zirkulierenden Lymphozyten mit steigender Strahlendosis beschrieben wurde. Die Korrelation zwischen Apoptoserate und Strahlendosis ist dabei wahrscheinlich auf die indirekte Wirkung IR durch die Bildung von Hydroxylradikalen zurückzuführen, welche mit den zellulären Makromolekülen, wie den Proteinen und der DNA, interagieren und diese schädigen (Bolus, 2001). Die Doppelstrangbrüche der DNA stellen dabei die kritischsten Schädigungen dar, da diese ohne Reparatur zu Genmutationen, Chromosomenaberrationen und zu einer Induktion der Apoptose führen können (Campa *et al.*, 2005). Der detektierte Anstieg der Apoptoserate mit steigender Strahlendosis lässt sich somit möglicherweise damit erklären, dass höhere Strahlendosen stärkere DNA-Schäden und infolge dessen eine erhöhte Induktion der Apoptose bewirken (Erasmus *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010).

4.1.2 Genexpressionsanalysen in humanen Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen in Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung wurden die generierten *Microarrays* zunächst dahingehend ausgewertet, Gene zu identifizieren, die nach Hochdosisbestrahlung signifikante Veränderungen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle aufwiesen. Dabei wurde ein Anstieg an signifikant veränderten Genen mit steigender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung beobachtet, wobei 48 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy die maximale Anzahl an signifikant veränderten Genen detektiert wurde (siehe 3.1.3).

Auch Jen und Cheung (2003) stellten nach Bestrahlung von lymphoblastoiden Zellen fest, dass mit steigender Strahlendosis die Anzahl an signifikant veränderten Genen zunahm. Dabei identifizierten Jen und Cheung (2003) in einem Zeitraum von 24 h nach γ -Bestrahlung mit 3 und 10 Gy 319 bzw. 816 strahleninduzierte Gene. Der von Jen und Cheung (2003) beobachtete Anstieg war dabei geringer als der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg an signifikant veränderten Genen nach Hochdosisbestrahlung. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Jen und Cheung (2003) mit lymphoblastoiden Zelllinien gearbeitet haben, wohingegen in der vorliegenden Arbeit äußerst strahlensensitive primäre Blutlymphozyten verwendet wurden. Der in beiden Studien identifizierte Anstieg an signifikant veränderten Genen mit steigender Strahlendosis liegt vermutlich darin begründet, dass höhere Strahlendosen größere Zellschädigungen verursachen (Pogosova-Agadjanyan *et*

al., 2011), wodurch die Induktion der Expression vieler für die Einleitung der DNA-Schadensantwort benötigter Gene vollzogen wird (Borras *et al.*, 2011).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Anstieg an signifikant veränderten Genen mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung detektiert, wofür bislang kein genauer Grund bekannt ist. Eine Erklärung könnte jedoch darin liegen, dass die durch die Bestrahlung ausgelöste Stressantwort der Zelle in proliferierenden Zelllinien schnell aktiviert wird, wohingegen in ruhenden, sich in der G₀-Phase befindenden Lymphozyten, wie in dieser Arbeit verwendet, eine Verzögerung der Induktion der für die Stressantwort benötigten Gene auftritt (Amundson *et al.*, 2000). In proliferierenden Zellen muss der DNA-Schaden schnell erkannt und behoben werden, damit ein langer Zellzyklusarrest für die DNA-Reparatur (Choudhury *et al.*, 2006; Ghosh & Bose, 2006) oder eine Weitergabe des Schadens an die Tochterzelle verhindert wird. Die in dieser Arbeit in die Experimente eingesetzten Lymphozyten hingegen waren teilungsinaktiv und konnten die strahleninduzierten DNA-Schäden folglich nicht an die Tochterzelle weitergeben, weshalb möglicherweise eine verzögerte Induktion der Schadensantwort nach Bestrahlung ausgelöst wurde, was sich in einem Anstieg der signifikant veränderten Gene mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung widerspiegelte.

4.1.3 Signalweganalysen signifikant veränderter Gene nach Hochdosisbestrahlung

Für die Durchführung von Signalweganalysen wurden Genlisten der zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hochdosisbestrahlung signifikant veränderten Gene mittels der *online*-Datenbank DAVID analysiert. Dabei erfolgte eine Zuordnung der in den Genlisten enthaltenen Gene zu verschiedenen Signalwegen (siehe 3.1.4; 3.1.5).

4.1.3.1 Der P53-Signalweg und zellzyklusrelevante Gene

Durch die Signalweganalysen wurde eine vorherrschende Induktion des P53-Signalwegs zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung detektiert, wobei die maximale Anzahl der diesem Signalweg zugeordneten Gene 24 h nach Bestrahlung erreicht wurde (siehe 3.1.4).

Auch Mori *et al.* (2005) führten Genexpressionsanalysen durch und konnten dabei 8 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy eine ausgeprägte Aktivierung des P53-Signalwegs in CD4⁺ T-Lymphozyten beobachten. Die in der vorliegenden Arbeit und von Mori *et al.* (2005)

beobachtete Induktion des P53-Signalwegs beruht möglicherweise auf der durch die γ -Bestrahlung der Lymphozyten induzierten Schädigung der DNA und dabei insbesondere auf der Induktion von Doppelstrangbrüchen (Hiom, 2010). Die durch die Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden führen zu einer Aktivierung der DNA-Reparaturmaschinerie, einem Zellzyklusarrest und bei einer nicht mehr zu beseitigenden Schädigung zu einer Induktion der Apoptose (Jen & Cheung, 2005; Lu *et al.*, 2010). Das nukleäre Phosphoprotein P53, das normalerweise nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden ist, akkumuliert nach der Einwirkung von Stressfaktoren, wie IR, in der Zelle (Tweddle *et al.*, 2003). Dabei moduliert P53 die Genexpressionen als Antwort auf zellulären Stress (Amundson *et al.*, 2005), indem es als Transkriptionsfaktor direkt an die Zielgene bindet, die den Zellzyklusarrest, die Zellseneszenz oder die Apoptose einleiten (Jin & Levine, 2001). Da in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Zunahme der Apoptoserate mit steigender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Hochdosisbestrahlung der Lymphozyten zu einer erheblichen Schädigung der DNA und infolge dessen zu einer P53-modulierten Apoptose geführt hat.

Durch die genaue Analyse der 6, 24 und 48 h nach Bestrahlung induzierten Zielgene von P53 wurden in der vorliegenden Arbeit Hochregulationen der Gene *BAX*, *PUMA* und des Todesrezeptors *DR5* detektiert. *PUMA* wirkt proapoptotisch, da es für den Transport eines Todessignal zu den Mitochondrien verantwortlich ist, indem es die Inhibierung des proapoptotischen Proteins *BAX* aufhebt (Yu & Zhang, 2008). Lediglich 6 h nach Bestrahlung lag eine Hochregulation des Gens *PERP* vor, das ein proapoptotisches Zielgen von P53 ist und in apoptotischen Zellen stark exprimiert wird (Reczek *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit detektierte frühe Hochregulation von *PERP* kann möglicherweise auf eine früh einsetzende Apoptose in stark geschädigten lymphatischen Zellen (Crompton & Ozsahin, 1997) nach der Einwirkung IR zurückgeführt werden, die mit einer P53-abhängigen Induktion von Genen korreliert (Amundson *et al.*, 2005). Des Weiteren konnten Hochregulationen für die Gene *MDM2* und *WIP1* detektiert werden. *WIP1* ist eine Phosphatase, die nach Schädigung der DNA P53-abhängig induziert wird, wohingegen *MDM2* eine E3 Ubiquitinligase und ein negativer Regulator von P53 ist (Wu & Leng, 2011), die die Stabilität und die Halbwertszeit von P53 durch die Ubiquitinierung des Proteins erniedrigt (Lee & Lozano, 2006). Die detektierte Hochregulation beider Gene weist dabei auf eine negative Regulation der durch P53 induzierten Stressantwort nach Schädigung der DNA hin (Salminen & Kaarniranta, 2011). Dies könnte auf eine Koordination der lymphozytären Schadensantwort hindeuten, indem beispielsweise durch *WIP1* der Aktivierung von ATM-CHEK2-P53 entgegengewirkt

wird (Le Guezennec & Bulavin, 2010). Außerdem wurde durch die γ -Bestrahlung von Lymphozyten die Expression des von P53-regulierten Gens *GADD45* (Sheikh *et al.*, 2000) gesteigert, dessen Protein unter anderem an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist (Hoffman & Liebermann, 2007), was wiederum die gesteigerte Apoptoserate in den bestrahlten Lymphozyten belegt.

Weiterhin wurden bei den Signalweganalysen 6 und 24 h nach Bestrahlung Gene dem Zellzyklus zugeordnet, obwohl die in der vorliegenden Arbeit in die Experimente eingesetzten Lymphozyten nicht stimuliert wurden und sich folglich in der G₀-Phase des Zellzyklus befanden (Mayer *et al.*, 2002). Auch in anderen Studien (Gruel *et al.*, 2008; Jen & Cheung, 2003; Mori *et al.*, 2005; Pogosova-Agadjanyan *et al.*, 2011) erfolgte bei Signalweganalysen eine Zuordnung signifikant veränderter lymphozytärer Gene zum Zellzyklus, die darauf zurückzuführen ist, dass an der Regulation des Zellzyklus Gene beteiligt sind, die auch in die DNA-Reparatur und die Apoptose involviert sind, wie beispielsweise die Gene *GADD45A* (Saini *et al.*, 2012), *PCNA* und *CDKN1A* (Mori *et al.*, 2005), die auch in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Änderung der Expression nach Bestrahlung aufwiesen (siehe Anhang Tab. 16).

Insgesamt geht aus den im Rahmen dieser Arbeit generierten Expressionsdaten hervor, dass nach Bestrahlung der P53-Signalweg deutlich aktiviert wurde, was auch schon von Mori *et al.* (2005) beschrieben wurde. Die Zuordnung von Genen zum Zellzyklus, die unter anderem auch in die Apoptose involviert sind, sowie die Aktivierung des P53-Signalwegs weisen somit auf eine strahlendinduzierte Steigerung der Apoptose hin. Dies wurde auch bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptoserate in der vorliegenden Arbeit bestätigt, wobei eine Steigerung des Anteils an apoptotischen Lymphozyten mit steigender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung detektiert wurde (siehe 3.1.1; 4.1.1).

4.1.3.2 Der Signalweg der Antigenprozessierung und -präsentation

Des Weiteren wurde mittels der Signalweganalysen eine Überrepräsentation der Antigenprozessierung und -präsentation detektiert, wobei eine Zuordnung von signifikant veränderten Genen zu diesem Signalweg erstmals 24 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy erfolgte (siehe 3.1.4; 3.1.5).

Die Antigenprozessierung und -präsentation wird vorgenommen, um die adaptive Immunantwort einzuleiten (Boes *et al.*, 2009). Dabei werden endogene Antigene nach einer Fragmentierung im Proteasom durch Kopplung an den Haupthistokompatibilitätskomplex I

(MHC I; Sijts & Kloetzel, 2011) an die Oberfläche kernhaltiger Zellen transportiert und den CD8⁺ T-Zellen präsentiert, wodurch diese zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren (Rutishauser & Kaech, 2010). Exogene Antigene hingegen werden durch den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) auf der Zelloberfläche den CD4⁺ T-Zellen präsentiert (Cobb *et al.*, 2004) und auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können über lyseaktivierende und -inhibierende Rezeptoren (KIR) Zielzellen eliminieren. Dabei binden die aktivierenden KIRs an MHC I, wodurch ein Signal zur Hemmung der Lyse in die NK-Zelle weitergeleitet wird. Eine Bindung der inhibierenden KIRs, deren Liganden bislang unbekannt sind, führt hingegen zu einer Weiterleitung von lysestimulierenden Signalen (Rajalingam, 2011). Letztendlich entscheidet die Summe der Signale darüber, ob die Zielzelle von der NK-Zelle lysiert wird oder nicht.

Die Hochregulation von *MHC I* 48 h nach Bestrahlung weist auf eine, durch die Bestrahlung des Vollbluts ausgelöste, verzögerte Immunreaktion der Lymphozyten hin. Bislang konnte von Hauser *et al.* (1993) eine Hochregulation von *MHC I* nach Bestrahlung von Gebärmutterkrebszellen und B16-Melanomzellen und von Chiriva-Internati *et al.* (2006) eine Hochregulation von *MHC I* Antigenen nach γ -Bestrahlung Multipler Myelom Zellen detektiert werden. Es ist bislang jedoch nicht bekannt, weshalb γ -Strahlung eine Hochregulation der Expression von Oberflächenantigenen induziert. Da Chiriva-Internati *et al.* (2006) aber eine länger andauernde Hochregulation der Zelloberflächenantigene nach γ -Bestrahlung von Multiplen Myelom Zellen detektierten, schlussfolgerten sie auf eine, durch die Bestrahlung ausgelöste, unspezifische Hochregulation der jeweiligen Gene. Die Runterregulation der für die Hemmung der Lyse der Zielzellen durch NK-Zellen verantwortlichen *KIR*-Gene sowie eine Runterregulation der für die Aktivierung der Lyse der Zielzelle durch NK-Zellen verantwortlichen *KLR*-Gene (siehe Anhang Tab. 20) liefern auch im Rahmen dieser Arbeit einen Hinweis auf eine unspezifische Regulation der Immunantwort nach Bestrahlung.

4.1.3.3 Der Systemische Lupus erythematoses Signalweg

Mittels der Signalweganalysen wurde zudem eine verzögerte Aktivierung des Systemischen Lupus erythematoses Signalwegs detektiert, wobei 48 h nach Bestrahlung die meisten Gene dieses Signalwegs aktiviert waren (siehe 3.1.4; 3.1.5).

Der Systemische Lupus erythematoses ist eine autoimmune Multiorganerkrankung (Koarada & Tada, 2012), bei der B-Zellen Autoantikörper gegen nukleäre Proteine und DNA

produzieren und somit Gewebeschäden induzieren (Mitchison & Wedderburn, 2000). Die durchgeführten Signalweganalysen zeigten eine deutliche Hochregulation der Histongene *H2A*, *H2B*, *H3* und *H4* 24 und 48 h nach Bestrahlung der Lymphozyten (siehe Anhang Tab. 18), die zusätzlich in qRT-PCR-Messungen für die Gene *HIST1H2AL* sehr deutlich und für *HIST1H4A* mäßig validiert werden konnten (siehe 3.1.6).

Die detektierten Hochregulationen der Histongene stehen im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Studien, wie beispielsweise zu der erst kürzlich veröffentlichten Studie von Meador *et al.* (2011), in welcher nach Bestrahlung einer lymphoblastoiden Zelllinie mit 1,67 Gy hoher LET- und 2,5 Gy niedriger LET-Strahlung ubiquitäre Runterregulationen der Histongene gemessen wurden. Auch Su *et al.* (2004) berichteten über eine Runterregulation der Histongene nach der Einwirkung IR, die auf eine Schädigung der DNA zurückführt. Infolge der DNA-Schädigung soll die Dissoziation von NPAT, einem essentiellen Regulator der Histogentranskription (Su *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001), vom Histongenpromotor eingeleitet werden, wodurch die Transkription der Histongene inhibiert wird. Außerdem wurde über eine Runterregulation der Histongene spekuliert, da durch Bestrahlung ein Zellzyklusarrest und folglich die DNA-Synthese in der S-Phase sich teilender Zellen angehalten wird, weshalb keine neuen Histone für die Wicklung neu synthetisierter DNA benötigt werden (Su *et al.*, 2004; Zhao, 2004). Die in der vorliegenden Studie eingesetzten Lymphozyten befanden sich jedoch in der G₀-Phase des Zellzyklus und waren teilungsinaktiv, weshalb die Replikation in der S-Phase des Zellzyklus und die damit verbundene maximale Hochregulation von Histogenen (Eliassen *et al.*, 1998; Osley, 1991) keine Erklärung für die nach Bestrahlung in den Lymphozyten im Rahmen dieser Arbeit erstmals detektierte Hochregulation der Histongene darstellt. Es ist jedoch möglich, dass die Hochregulation der Histongene darauf beruht, dass in den teilungsinaktiven Lymphozyten diese Gene in den Kontrollen sehr gering exprimiert werden, jedoch in den bestrahlten Zellen aufgrund der stattfindenden DNA-Reparatur hochreguliert werden, um Nukleosomen für die neu synthetisierten DNA-Bereiche zu bilden und deren korrekte Verpackung zu gewährleisten (siehe Anhang Tab. 18).

4.1.3.4 Die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion

Auch der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion wurde durch die Signalweganalysen eine hohe Anzahl an signifikant veränderten Genen, besonders 48 h nach Bestrahlung, zugeordnet, die mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung anstieg (siehe 3.1.4).

Als Zytokine werden Moleküle bezeichnet, die unter anderem von Leukozyten sezerniert werden (Taub, 2004) und an Rezeptoren auf der Oberfläche anderer Zellen binden, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade eingeleitet wird, die schließlich zu der Aktivierung von spezifischen Genen führt. Dabei sind Zytokine beteiligt an der „Regulierung der Ontogenese, der Gewebereparatur, der Immunabwehr, der Entzündung, der Kontraktilität in Herz und Gefäßen, der Aufrechterhaltung der Körperprozesse und des Zellsterbens“ (Loppnow, 2001). Aufgrund ihrer Funktion lassen sich Zytokine in Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren, transformierende Wachstumsfaktoren, Chemokine und Virokine unterteilen (Loppnow, 2001). Bei den durchgeführten Signalweganalysen wurde insgesamt eine Hochregulation von Tumornekrosefaktoren und -rezeptoren detektiert (siehe Anhang Tab. 19). Dabei konnte auch eine Hochregulation des Todesrezeptors *FAS* gemessen werden, dessen Expression nach Schädigung der DNA durch endogene oder exogene Faktoren von P53 aktiviert wird (Roos & Kaina, 2006). Durch die Aktivierung des membrangebundenen Todesrezeptors *FAS* wird der extrinsische Signalweg der Apoptose induziert, was zu einer Assemblierung des intrazellulären DISC-Komplexes und letztlich zu einer Aktivierung der Caspase-8 führt (Green *et al.*, 2003; Strasser *et al.*, 2009), die ihrerseits die Caspase-Kaskade in Gang setzt. Da das *FAS*/*FASLG*-System eine essentielle Rolle in der strahleninduzierten Apoptose spielt (Kimura & Gelmann, 2000) und die Expression von *FAS* nach Schädigung der DNA von P53 aktiviert wird (Martin *et al.*, 2005), kann die in der vorliegenden Arbeit detektierte Hochregulation von *FAS* möglicherweise auf eine strahleninduzierte Schädigung der DNA zurückgeführt werden, die in einer Induktion der lymphozytären Apoptose resultierte.

4.1.3.5 Zusammenfassung der aktivierten Signalwege

Insgesamt deckten die auf der Grundlage der signifikant veränderten Gene durchgeführten Signalweganalysen eine Induktion apoptoserelevanter Gene auf, was sich an der deutlichen Induktion des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Induktion spezifischer Tumornekrosefaktoren, die der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion zugeordnet wurden, erkennen ließ. Bestätigt wurden die auf Genexpressionsebene erhaltenen Ergebnisse durch die Apoptosemessungen der bestrahlten Lymphozyten, durch welche ein strahleninduzierter Anstieg der Apoptoserate mit steigender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung detektiert wurde. Des Weiteren wurde durch die, im Gegensatz zu bislang veröffentlichten Studien (Meador *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2004), konträren Ergebnisse der Hochregulation von

Histongen, die dem Systemischen Lupus erythematoses Signalweg zugeordnet wurden, herausgefunden, dass in proliferierenden Zellen möglicherweise andere Genregulationen nach Schädigung der DNA erfolgen als in ruhenden Lymphozyten, wie in die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente eingesetzt.

4.2 Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung

Bei der Auswertung der *Microarrays* wurden 16 Gene identifiziert, die *in vitro* zwischen 6 und 48 h nach Bestrahlung für Dosiszuordnungen zwischen 0,5 und 4 Gy geeignet sind, wobei eine Vorhersagegenauigkeit der Strahlendosis von 95,7% erreicht wurde (Boldt *et al.*, 2012). Sieben der 16 Gene, *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *SPATA18*, *DOK7* und *LGR6*, wiesen dabei die robustesten Expressionsänderungen nach Bestrahlung auf und waren in jeder der für die Detektion der Markergene generierten Genlisten unter den Genen mit den größten Expressionsunterschieden nach Bestrahlung enthalten (siehe 3.2). Die robusten Expressionsänderungen dieser Gene sind dabei möglicherweise auf ihre Funktion zurückzuführen, wobei die detaillierte Funktion sowie ihre Beteiligung an der durch die Bestrahlung induzierten Stressantwort der Zelle bislang nicht vollständig geklärt sind.

4.2.1 Funktion und Strahleninduktion der robustesten Markergene

FDXR ist ein mitochondrielles Flavoprotein, das sich an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran befindet und Elektronen von NADPH über Ferredoxin zum Cytochrom P450 transportiert (Yu *et al.*, 2003; Ziegler *et al.*, 1999). Dabei ist *FDXR* ein Zielgen der P53-Familie, dessen Expression durch die Schädigung der DNA, beispielsweise hervorgerufen durch die Einwirkung von IR, P53-abhängig induziert werden kann (Liu & Chen, 2002). Auch *PHLDA3* ist ein Zielgen von P53, das an der Einleitung der P53-abhängigen Apoptose beteiligt ist, indem die PH-Domäne von *PHLDA3* mit der PH-Domäne des Proteins AKT konkurriert, welches für die Weiterleitung von Signalen für das Überleben der Zelle verantwortlich ist (Kawase *et al.*, 2009). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie berichteten Bornstein *et al.* (2011), dass auch *SPATA18* ein Zielgen von P53 ist und möglicherweise eine tumorsuppressive Funktion während des programmierten Zelltods ausübt. Durch die Einwirkung von IR auf Zellen werden eine Vielzahl von DNA-Schädigungen induziert, wie Einzel- und Doppelstrangbrüche oder Basen- und Zuckerschäden

(Fei & El-Deiry, 2003; Hutchinson, 1985; Ward, 1988). Wenn der durch die Bestrahlung induzierte DNA-Schaden zu groß ist oder die Reparatur der DNA fehlschlägt, ist die im Rahmen dieser Arbeit detektierte Aktivierung von *FDXR*, *PHLDA3* und *SPATA18* sehr wahrscheinlich auf die P53-abhängige Einleitung der strahleninduzierten Apoptose in Lymphozyten zurückzuführen.

Ein weiteres als robust identifiziertes Markergen ist *TNFSF4*, dessen Protein der Ligand von TNFRSF4 ist und das eine essentielle Rolle in der Erhaltung langlebiger CD4⁺ T-Zellen ausübt sowie die kontinuierliche Proliferation und die klonale Expansion von CD4⁺ T-Zellen während der späten Phase der Immunantwort fördert (Wang *et al.*, 2009). Eine genaue Erklärung für die strahleninduzierte Steigerung der Expression von *TNFSF4* ist bislang nicht bekannt, doch auch Kondo *et al.* (2008) konnten eine deutliche Steigerung der Expression von TNFSF4 nach der Einwirkung von Röntgen- und UV-Strahlung in T-Zellen nachweisen. Dabei begründeten sie die Induktion unter anderem damit, dass TNFSF4 als Resultat von DNA-Reparaturprozessen synthetisiert wird, wodurch TNFSF4-positive T-Zellen über die Stimulation eines antiapoptotischen Signalwegs in TNFRSF4-positiven Zellen den programmierten Zelltod unterdrücken. Eine weitere Erklärung für die Oberflächenpräsentation von TNFSF4 nach Schädigung der DNA und Einleitung der Apoptose könnte darin bestehen, dass die Präsentation von TNFSF4 ein Signal für die Beseitigung der geschädigten Zellen durch Makrophagen oder dendritische Zellen darstellt (Kondo *et al.*, 2008).

Die Funktion der Markergene *VWCE*, *DOK7* und *LGR6* ist bislang nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass *VWCE* ein regulatorisches Element des β -Catenin-Signalwegs ist (Zou *et al.*, 2006), das β -Catenin in Tumorzellen aktiviert (Du *et al.*, 2010a). Dies hat zur Folge, dass β -Catenin in der Zelle akkumuliert (Du *et al.*, 2010b) und im Zellkern die Expression von für die Tumorgenese verantwortlichen Genen über die Bindung an Transkriptionsfaktoren begünstigt (Du *et al.*, 2010a; Lian *et al.*, 2006). Über *DOK7* ist bekannt, dass es essentiell für die neuromuskuläre Synaptogenese ist, da es die Tyrosinphosphorylierung von MuSK induziert, was in zahlreichen differenzierten Acetylcholinrezeptorclustern resultiert (Vogt *et al.*, 2009). Snippert *et al.* (2010) identifizierten *LGR6* als einen Marker von Vorläuferzellen, die in verschiedene Zelllinien der Epidermis differenzieren können. Eine genaue Erklärung für die Induktion dieser Gene nach Bestrahlung liegt bislang nicht vor. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Fischer *et al.* (2012) aber wird behauptet, dass IR in humanen embryonalen Stammzellen die Differenzierung fördert, wodurch die Zellen dem apoptotischen Zelltod entgehen. Da auch

VWCE, *DOK7* und *LGR6* an Differenzierungsprozessen beteiligt sind, stellt dies möglicherweise eine Erklärung für die Induktion der Expression dieser Gene nach Bestrahlung dar.

4.2.2 Markergene mit geringen Expressionsänderungen

Auch für die weiteren neun Gene, die für eine genaue Dosiszuordnung benötigt werden, aber nicht in jeder der für die Detektion der Markergene generierten Genlisten unter den Genen mit dem größten Expressionsunterschied nach Bestrahlung vorhanden waren, sind die genauen Funktionen, insbesondere im Hinblick auf die Induktion nach Bestrahlung, weitestgehend ungeklärt. Die Aktivierung von *ISG20L1* und die Repression von *TCL1A* (siehe Anhang Tab. 21) können jedoch mit der bislang bekannten Funktion dieser Gene nach Bestrahlung erklärt werden. *ISG20L1* ist ein Zielgen der P53-Familie (Eby *et al.*, 2010), dessen Protein eine Exonuklease ist, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA und RNA schneidet (Kawase *et al.*, 2008). Eine Hochregulation der Expression von *ISG20L1* weist daraufhin, dass durch die Einwirkung von IR starke DNA-Schäden verursacht wurden, die in der Induktion der Apoptose resultieren, wobei *ISG20L1* an einer effizienten Fragmentierung der DNA mitwirkt (Kawase *et al.*, 2008). Das *TCL1* Protein hingegen bindet vermutlich an *AKT*-Proteine, wodurch die Effektorfunktionen dieser gesteigert und die Zellproliferation und das Überleben der Zelle verstärkt werden (Lau *et al.*, 2010). Eine Runterregulation dieses Gens weist auf eine verstärkte Induktion der Apoptose nach Bestrahlung hin, da die Expression des für das Überleben der Zelle benötigten Proteins *TCL1* unterdrückt wird.

4.2.3 Vergleich der robustesten Markergene mit weiteren biodosimetrischen Studien

Der Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Gene mit den Ergebnissen anderer Genexpressionsstudien zeigt, dass *FDXR*, *TNFSF4* und *PHLDA3* nach Exposition mit niedriger LET-Strahlung hochspezifisch ihre Genexpression verändern (Kabacik *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2005; Pogossova-Agadjanyan *et al.*, 2011). Kabacik *et al.* (2011) beispielsweise beschrieben eine Hochregulation von *FDXR* in menschlichen sich teilenden Lymphozyten und peripheren Blutleukozyten nach einer *ex vivo* Bestrahlung mit 2 und 4 Gy. Kis *et al.* (2006) detektierten eine Hochregulation von *FDXR* in primären humanen Fibroblasten nach einer Bestrahlung mit 2 Gy. In T-Lymphozyten wurde außerdem eine strahleninduzierte

Steigerung der Expression von *TNFSF4* und *PHLDA3* von Pogossova-Agadjanyan *et al.* (2011) gemessen und Mori *et al.* (2005) wiesen eine erhöhte Genexpression von *PHLDA3* und *FDXR* in CD4⁺ T-Lymphozyten nach einer Bestrahlung mit 1 Gy nach. Die meisten Übereinstimmungen zu der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsstudie sind jedoch in der Studie von Paul und Amundson (2008) enthalten. Paul und Amundson (2008) identifizierten in *ex vivo* bestrahlten Lymphozyten ein Set von 74 Genen, welches *in vitro* für die Diskriminierung von unbestrahlten Proben (0 Gy) und Proben, die mit 0,5, 2 und mit Strahlendosen ≥ 5 Gy bestrahlt worden sind, geeignet ist. Unter Verwendung des aus 74 Genen bestehenden Gensets wurde dabei eine Genauigkeit der Dosiszuordnung von 98% im Zeitraum zwischen 6 und 24 h nach Bestrahlung erreicht. Insgesamt fünf der 74 von Paul und Amundson (2008) identifizierten Gene, *FDXR*, *TNFSF4*, *VWCE*, *ISG20L1* und *C8orf38* sind Teil des aus 16 Genen bestehenden und im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Gensets, welches *in vitro* für die Dosiszuordnung nach Hochdosisbestrahlung geeignet ist (siehe 3.2).

4.2.4 Anwendbarkeit *in vitro* generierter Markergene auf *in vivo* Dosisabschätzungen

Das von Paul und Amundson (2008) *ex vivo* generierte 74-Genset wurde in einer weiteren Studie verwendet, um die Dosis *in vivo* bestrahlter Personen abzuschätzen (Paul *et al.*, 2011). Dazu wurde Patienten, die sich einer Ganzkörperbestrahlung vor einer Stammzelltransplantation unterziehen mussten, vor der Bestrahlung, nach einer Bestrahlung mit 1,25 Gy und einer akkumulierten Bestrahlung mit 3,75 Gy, Blut entnommen. Im Anschluss an die Isolation der lymphozytären RNA wurde diese auf *Microarrays* aufgetragen und mit einer Genauigkeit von 98% wurden die Proben unter Verwendung des 74-Gensets der richtigen Strahlendosis zugeordnet. Ein aus den *in vivo* generierten Proben identifiziertes Set bestehend aus 152 Genen hingegen erbrachte eine Vorhersagegenauigkeit der *in vivo* erhaltenen Strahlendosis von 96%. Letztlich wurde dadurch gezeigt, dass auch ein *ex vivo* generiertes Genset für *in vivo* Dosisabschätzungen geeignet ist. Zudem wurden fünf der 74 von Paul und Amundson (2008) identifizierten Markergene auch in der vorliegenden Arbeit identifiziert, weshalb sich vermuten lässt, dass auch das in dieser Arbeit ermittelte Genset für *in vivo* Dosisabschätzungen geeignet ist.

4.2.5 Zusammenfassung der Anwendbarkeit *in vitro* identifizierter Markergene für die Biodosimetrie

Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien zeigen, dass es möglich ist, auf der Grundlage von Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung Vorhersagen über die individuelle Strahlendosis treffen zu können. Des Weiteren wurde besonders durch die von Paul *et al.* (2011) durchgeführte Studie an Proben von *in vivo* bestrahlten Personen deutlich, dass identifizierte Gensets aus *ex vivo* bestrahlten Lymphozyten äußerst gut für Vorhersagen *in vivo* bestrahlter Proben geeignet sind (Paul *et al.*, 2011). Die Übereinstimmungen der in dieser Arbeit identifizierten Gene mit dem von Paul und Amundson (2008) *ex vivo* generierten 74-Genset lassen deshalb den Schluss zu, dass auch die in dieser Arbeit identifizierten 16 Markergene für biodosimetrische Applikationen nach Hochdosisbestrahlung geeignet sind. Das in dieser Arbeit generierte Genset bietet zudem den Vorteil, dass deutlich weniger Gene für die Dosisabschätzung benötigt werden als bei der Verwendung des von Paul und Amundson (2008) generierten Gensets. Des Weiteren sind die in dieser Arbeit identifizierten Markergene für Dosisabschätzungen bis zu 48 h nach Bestrahlung geeignet, wohingegen das von Paul und Amundson (2008) identifizierte Genset bislang nur für Vorhersagen bis zu 24 h nach Bestrahlung getestet wurde. Außerdem basieren die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Markergene auf gepoolten RNA-Proben, die sich aus der RNA von sechs gesunden Spendern zusammensetzten, wodurch Gene identifiziert wurden, die ein strahleninduziertes Expressionsprofil aufweisen, das unabhängig von individuellen Expressionsprofilen ist (Boldt *et al.*, 2012).

4.3 Validierung der Expressionsänderungen identifizierter Markergene

Die Analyse der *Microarrays* führte zu der Identifizierung von 16 Genen, die *in vitro* für Dosisabschätzungen im Hochdosisbereich zwischen 0,5 und 4 Gy bis zu 48 h nach Bestrahlung geeignet sind (siehe 3.2). Dabei wurden für sieben dieser Gene, *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *VWCE*, *SPATA18*, *DOK7* und *LGR6*, die robustesten Genexpressionsänderungen detektiert, weshalb diese Gene ausgewählt wurden, um an diesen in qRT-PCR-Messungen gezielte Genexpressionsanalysen durchzuführen (siehe 3.2.1.2; 3.2.2).

4.3.1 QRT-PCR-basierte Validierung ausgewählter Markergene nach Hochdosisbestrahlung

Die Validierung der *Microarray*-Ergebnisse erfolgte, wie auch schon von anderen Gruppen beschrieben (Kis *et al.*, 2006; Paul & Amundson, 2008), an ausgewählten Genen. Dazu wurde die Expression der sieben robusten Markergene zunächst unter Verwendung von gepoolten Proben, die auch in die *Microarray*-Experimente eingesetzt wurden, mittels qRT-PCR detektiert. Die Genexpressionsänderungen konnten dabei für sechs der Markergene erfolgreich validiert werden, wohingegen für *LGR6* in den *Microarray*-Messungen starke Expressionsänderungen und in den qRT-PCR-Messungen nur sehr geringe Änderungen der Expression nach Bestrahlung beobachtet wurden (siehe 3.2.1.2).

Auch in anderen Genexpressionsstudien (Kang *et al.*, 2003; Pogossova-Agadjanyan *et al.*, 2011) wurden teilweise Abweichungen zwischen den auf der Analyse der *Microarrays* basierenden Expressionswerten ausgewählter Gene zu den zur Validierung der Ergebnisse durchgeführten RT-PCR- oder qRT-PCR-Messungen detektiert. Die Diskrepanz der mit zwei verschiedenen Methoden gemessenen Genexpression kann dabei zum einen daraus resultieren, dass alternative Spleißformen, wie in 40 – 60% der humanen Gene beobachtet, an das Oligonukleotid auf dem *Microarray* hybridisiert haben (Boldt *et al.*, 2012; Rockett & Hellmann, 2004). Dies kann zur Folge haben, dass mittels qRT-PCR möglicherweise die Expression einer Spleißvariante ermittelt wurde, deren Expression nach Bestrahlung nicht gesteigert wurde. Zum anderen kann die Abweichung der *Microarray*- und der qRT-PCR-Ergebnisse möglicherweise auf die generell sehr geringe Expression eines Gens, wie z.B. in dieser Arbeit bei *LGR6*, zurückgeführt werden. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Liu *et al.* (2012) wurde gezeigt, dass die Übereinstimmungen zwischen *Microarray*- und qRT-PCR-Ergebnissen für stark exprimierte Gene äußerst hoch sind, wohingegen weitaus geringere Übereinstimmungen für generell schwach exprimierte Gene detektiert wurden.

In die in dieser Arbeit durchgeführten *Microarray*-Experimente und für die Validierung der *Microarray*-Ergebnisse wurden, wie auch in anderen Genexpressionsstudien beschrieben (Kis *et al.*, 2006; Poulsen *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012), gepoolte RNA-Proben verschiedener Spender eingesetzt (siehe 2.2.3.2; 2.2.3.3; 2.2.3.4). Das Poolen der RNA-Proben kann dabei erfolgen, wenn die aus dem Gewebematerial eines Individuums zu untersuchende Menge an isolierter RNA für die *Microarray*-Präparation nicht ausreicht (Peng *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2004). Zudem werden RNA-Proben gepoolt, um die Anzahl der anzufertigenden *Microarrays* zu reduzieren und somit eine Kostenreduktion zu erreichen (Zhang *et al.*, 2007). Der Hauptgrund aber besteht darin, dass durch das Poolen der RNA-Proben die Effekte

biologischer Variationen zwischen den zu untersuchenden Individuen reduziert werden (Kendzioriski *et al.*, 2003), weshalb auch im Rahmen dieser Arbeit für die Präparation der *Microarrays* gepoolte RNA-Proben verwendet wurden (siehe 3.1.3).

4.3.2 Charakterisierung der individuellen Expressionen an ausgewählten Markergenen

Um nach der Validierung der *Microarray*-Ergebnisse durch die Verwendung der gepoolten RNA-Proben in qRT-PCR-Messungen dennoch die interindividuellen Variationen in den Genexpressionen der identifizierten Markergene untersuchen zu können, wurden nicht-gepoolte RNA-Proben von sechs Spendern in weitere qRT-PCR-Messungen eingesetzt (siehe 3.2.2). Es erfolgte wiederum die Quantifizierung der Expression der sieben robusten Markergene. Dabei wurde für sechs der Gene ein deutlicher Anstieg der Genexpression nach Bestrahlung detektiert, der ähnlich der Expression dieser Gene war, die unter Verwendung der gepoolten Proben in den qRT-PCR-Messungen detektiert wurde.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass eine Vielzahl von Genen von Individuum zu Individuum unterschiedlich stark exprimiert wird. Rogue *et al.* (2012) detektierten zum einen eine starke Variabilität in der Anzahl der exprimierten Gene und zum anderen eine starke Variabilität des Transkriptionslevels der exprimierten Gene in Leberzellen. Auch Peters *et al.* (2007) verglichen die Transkriptionsraten von Genen aus dem Vollblut von 15 gesunden Spendern miteinander und stellten fest, dass die biologischen Variationen höher als die technischen Variationen waren. Im Gegensatz dazu zeigten die Genexpressionsanalysen an Einzelspenderproben in dieser Arbeit nur geringe interindividuelle Expressionsunterschiede. Die Altersspanne der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spender reichte dabei von 23 bis hin zu 49 Jahren und es wurde die Expression der Markergene in den Lymphozyten von weiblichen und männlichen Spendern untersucht. Dabei konnten weder interindividuelle Expressionsunterschiede aufgrund des Alters noch aufgrund des Geschlechts, wie auch schon von Paul und Amundson (2008) beschrieben, detektiert werden. Lediglich für *LGR6* konnte kein deutlicher Anstieg der Expression nach Bestrahlung gemessen werden, wobei die Gründe dafür bereits in der Diskussion der Ergebnisse der gepoolten Proben im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden (siehe 4.3.1).

4.3.3 Vergleich der Genexpressionsänderungen

Der Vergleich der Expressionswerte von *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *VWCE* und *SPATA18* (siehe 3.2.3), gemessen mittels *Microarrays* und qRT-PCR, zeigte, dass gepoolte Proben, wie in dieser und in anderen Studien verwendet (Kis *et al.*, 2006; Port *et al.*, 2007; Poulsen *et al.*, 2011), für Genexpressionsanalysen basierend auf *Microarrays* geeignet sind. Dabei erlaubte die Verwendung gepoolter Proben in den *Microarray*-Experimenten eine Reduktion der biologischen Variationen zwischen den untersuchten Individuen (Kendzioriski *et al.*, 2003), wodurch Markergene identifiziert wurden, die auch in qRT-PCR-Messungen an nicht-gepoolten Proben von sechs Spendern sehr ähnliche Expressionsänderungen wie in den *Microarray*-Experimenten aufwiesen. Die geringen interindividuellen Expressionsunterschiede der identifizierten Markergene sowie ihre klare Dosis-Antwort-Beziehung nach Bestrahlung (Paul & Amundson, 2008) machen diese deshalb zunächst *in vitro* zu geeigneten Biomarkern für biodosimetrische Applikationen nach Hochdosisbestrahlung.

4.4 Korrelation zwischen Transkription und Translation nach Bestrahlung

Um zu überprüfen, inwieweit sich die detektierten Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung auf den Proteinstatus abbilden lassen, wurden von *FDXR* und *TNFSF4*, welche sehr robuste Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung aufwiesen, die Proteinmengen bestimmt (siehe 3.2.4). Für *TNFSF4* wurde dabei die maximale Proteinmenge 48 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy gemessen und war etwa 1,7-fach höher als die Proteinmenge von *TNFSF4* in der Kontrolle (siehe 3.2.4.1). Auch für *FDXR* konnten Anstiege der Proteinexpression besonders 48 h nach Bestrahlung detektiert werden. Dabei wurde die höchste Expression 48 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy beobachtet, die mehr als doppelt so hoch wie die Expression von *FDXR* in der Kontrolle war (siehe 3.2.4.2).

Bislang liegen keine genauen Daten über den Anstieg der Proteinmenge von *FDXR* und *TNFSF4* nach Bestrahlung vor. Ein Anstieg der Proteinmenge von *FDXR* konnte jedoch von Hwang *et al.* (2001) in HCT116-Wildtypzellen 48 h nach Inkubation mit der DNA-schädigenden Substanz 5-Fluorouracil beobachtet werden, wobei die Expression von *FDXR* nach Inkubation mit 5-Fluorouracil mehr als dreimal so hoch wie in der Kontrolle war.

Der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg der Proteinexpression von *TNFSF4* und *FDXR* wies keine direkte Korrelation zu der Genexpression auf, da der Proteinexpressionsanstieg nur sehr

gering war und mit zunehmender Strahlendosis nicht deutlich anstieg, wohingegen die Genexpression von *TNFSF4* und *FDXR* mit steigender Strahlendosis zunahm.

Ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit mit einer hohen Variabilität der Korrelation wurden auch in anderen Studien erzielt, in denen die Übereinstimmungen zwischen mRNA- und Proteinmenge untersucht wurden (Pascal *et al.*, 2008). Turtoi *et al.* (2010) beispielsweise detektierten in Lymphozyten direkt nach γ -Bestrahlungen mit 1, 2 und 4 Gy eine Hochregulation der Genexpression von *JUN*, wohingegen kein Anstieg der Proteinmenge von JUN beobachtet werden konnte. Gygi *et al.* (1999) beschrieben, dass außer für sehr häufig in der Zelle benötigte Proteine, auch ohne die Einwirkung von Stressfaktoren, die RNA-Menge nicht mit der Proteinmenge übereinstimmte und auch Chen *et al.* (2002) konnten in Krebszellen von Lungenkarzinomen keine signifikanten Übereinstimmungen zwischen mRNA- und Proteinexpression detektieren. Lichtinghagen *et al.* (2002) untersuchten die Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in Prostatakrebszellen und auch in dieser Studie konnte keine Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge detektiert werden.

Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen beobachteten Bae *et al.* (1995) jedoch, dass 4 h nach einer γ -Bestrahlung mit 6,3 Gy in Burkitt's Lymphomzellen die Genexpression von *P21* mit der Proteinmenge korrelierte, wobei die maximale Menge an RNA und Protein 4 h nach Bestrahlung detektiert wurde. Eine weitere nicht-strahleninduzierte Übereinstimmung in Gen- und Proteinexpression konnte von Schlemmer *et al.* (2004) für HER2/neu in Brusttumoren nachgewiesen werden.

Insgesamt geht aus den durchgeführten Studien hervor, dass nur in 20 – 40% der Untersuchungen eine Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge vorliegt (Pascal *et al.*, 2008). Ein Grund dafür besteht darin, dass Proteine sehr unterschiedliche Halbwertszeiten haben (Greenbaum *et al.*, 2003). Proteine mit zentraler Funktion und kurzer Halbwertszeit müssen daher häufiger translatiert werden als Proteine mit einer hohen Halbwertszeit, so dass von diesen mehr mRNA-Moleküle vorhanden sein müssen, was jedoch nicht in einer erhöhten Proteinmenge resultiert.

Da ein strahlenbedingter, generell erhöhter, Proteinabbau eine plausible Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen Genexpression und Proteinstatus darstellt, wurden Versuche mit Bestrahlung und paralleler Hemmung der Translation durchgeführt (siehe 3.2.4.3). Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge von FDXR zwischen den translationsgehemmten Kontrollen und den bestrahlten und translationsgehemmten Proben detektiert werden, was sehr stark darauf hindeutet, dass der Proteinabbau von FDXR durch die Einwirkung von IR nicht beschleunigt wurde.

Letztlich könnte eine Erklärung für die geringe Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge darin liegen, dass post-transkriptionale Modifikationen an der mRNA vorgenommen werden (Greenbaum *et al.*, 2003), die zur Folge haben, dass nicht jedes mRNA-Molekül auch translatiert wird. Diese post-transkriptionalen Modifikationen sind bislang jedoch noch nicht genügend bekannt, um von diesen auf die zu erwartende Proteinmenge schließen zu können (Greenbaum *et al.*, 2003). Dennoch könnten post-transkriptionale Modifikationen dafür verantwortlich sein, dass keine direkte Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge für TNFSF4 und FDXR detektiert werden konnte.

4.5 Zelluläre und molekulare Effekte der Inkubation mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C in Lymphozyten

Die strahlenspezifische Induktion der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten sieben robusten Markergene *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *VWCE*, *SPATA18*, *DOK7* und *LGR6* wurde untersucht, indem Lymphozyten mit den DNA-schädigenden Substanzen 4-Acetamidophenol und Mitomycin C inkubiert wurden. 6, 24 und 48 h nach Inkubationsbeginn erfolgte die Charakterisierung der durch die beiden Substanzen ausgelösten Effekte (siehe 3.2.5).

4.5.1 Apoptoserate nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation

Zunächst wurde die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen von 4-Acetamidophenol und Mitomycin C auf die Apoptoserate von kultivierten Lymphozyten untersucht (siehe 3.2.5.1). Dabei zeigte sich, dass der Anteil an vitalen Lymphozyten 6 h nach Inkubationsbeginn mit 200 µg/ml 4-Acetamidophenol von 94 auf 78% 48 h nach Inkubationsbeginn abfiel.

Auch Boulares *et al.* (2002) untersuchten *in vitro* die Induktion der Apoptose in humanen peripheren Blutlymphozyten. Dazu wurden die Lymphozyten mit einer ca. 7,6-fach höheren Konzentration an 4-Acetamidophenol als in dieser Arbeit inkubiert und der Anteil an vitalen Lymphozyten alle 12 h mittels des Annexin-V Propidiumiodid Assays fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dabei wurde eine deutliche Abnahme der vitalen Lymphozyten mit steigender Inkubationsdauer beobachtet, wobei der Anteil an vitalen Lymphozyten von 100% zu Beginn der Inkubation auf ca. 35% nach einer 36-stündigen Inkubation sank. Ruppova *et al.* (1999) bestimmten durchflusszytometrisch den Anteil an

vitalen HeLa-Zellen nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol und konnten dabei eine signifikante Abnahme an vitalen Zellen nach 8-stündiger Inkubation mit sehr hohen Konzentrationen von 3, 4 und 5 mg/ml 4-Acetamidophenol beobachten.

Auch die Inkubation mit 0,4 µg/ml Mitomycin C führte in dieser Arbeit zu einer Abnahme an vitalen Lymphozyten, wobei der vitale Anteil der Lymphozyten 6 h nach Inkubationsbeginn bei 94% und 48 h nach Inkubationsbeginn bei 72% lag.

Eine Verringerung des Anteils an vitalen Zellen nach Inkubation mit Mitomycin C konnte beispielsweise auch von Pirnia *et al.* (2002) in der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF-7 beobachtet werden. In der Studie wurden die Zellen mit einer 12,5-fach höheren Konzentration, als in dieser Arbeit eingesetzt, inkubiert und der Anteil an vitalen MCF-7 Zellen fiel von ca. 85% 24 h nach Inkubationsbeginn auf 20% 72 h nach Inkubationsbeginn ab.

Sowohl für 4-Acetamidophenol als auch für Mitomycin C ist die in den beschriebenen Studien beobachtete hohe Apoptoserate nach Inkubation zum einen auf höhere Konzentrationen der Substanzen und zum anderen auf längere Inkubationszeiten zurückzuführen. Die im Rahmen dieser Arbeit und in den Studien insgesamt detektierte Erhöhung der Apoptoserate liegt dabei wahrscheinlich in der genotoxischen Wirkung von 4-Acetamidophenol und Mitomycin C begründet. Die genotoxische Wirkung von 4-Acetamidophenol wurde dabei unter anderem in einer Studie von Simkó *et al.* (1998) und Giri (1993) *in vivo* in Knochenmarkszellen von Mäusen und von Ibrulj *et al.* (2007) in humanen Lymphozyten durch die Bildung von Mikrokernen nachgewiesen. Die genotoxische Wirkung von Mitomycin C hingegen wurde schon früh in einer Studie von Evans und Vijayalaxmi (1980) durch den Nachweis der Induktion von Chromosomenaberrationen in ruhenden Lymphozyten nach Inkubation mit Mitomycin C detektiert.

4.5.2 Genexpressionen nach 4-Acetamidophenol und Mitomycin C Inkubation

Mittels qRT-PCR-Messungen wurden Genexpressionsanalysen der sieben Markergene nach Inkubation mit den DNA-schädigenden Substanzen 4-Acetamidophenol und Mitomycin C durchgeführt. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der Genexpression von *FDXR*, *TNFSF4*, *PHLDA3*, *VWCE* und *SPATA18* 48 h nach Inkubationsbeginn mit 0,4 µg/ml Mitomycin C detektiert (siehe 3.2.5.2).

Bislang sind keine genauen Daten über die Genexpressionsänderung dieser fünf Gene nach Behandlung mit 4-Acetamidophenol oder Mitomycin C verfügbar. In einer Studie von

Kerley-Hamilton *et al.* (2005) aber wurden menschliche teratokarzinome NT2/D1-Hodenzellen mit dem DNA-schädigenden Zytostatikum Cisplatin in einer Konzentration von 0,15 µg/ml für 6 h inkubiert, worauf eine 24-stündige Erholungsphase der Zellen erfolgte. Die anschließenden, auf *Microarrays* basierenden, Genexpressionsanalysen zeigten dabei eine ca. 2,8-fach höhere Expression von *PHLDA3*, die vergleichbar zu der in dieser Arbeit detektierten Expressionsänderung von *PHLDA3* 24 h nach Inkubation mit 0,4 µg/ml Mitomycin C war. Des Weiteren konnte in der Studie von Kerley-Hamilton *et al.* (2005) eine ca. 3-fach höhere Expression von *FDXR* als in der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden, die etwas geringer als die in dieser Arbeit gemessene Expressionsänderung von *FDXR* 24 h nach Inkubation mit 0,4 µg/ml Mitomycin C war. Auch Liu und Chen (2002) berichteten über einen Anstieg der Genexpression von *FDXR* in verschiedenen P53-Wildtyp Zelllinien nach einer Behandlung mit der DNA-schädigenden Substanz Camptothecin. Ein Anstieg von TNFSF4-positiven primären T-Zellen wurde von Kondo *et al.* (2008) nach einer 24-stündigen Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Mitomycin C und Stimulation der Zellen beobachtet. Die in dieser Arbeit generierten Daten sowie die vorliegende Literatur weisen darauf hin, dass *FDXR* ein auf genotoxischen Stress robust antwortendes Gen ist.

In einem Vergleich der nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C (siehe 3.2.5.2) mit den nach Bestrahlung gemessenen Expressionen (siehe 3.2.2) der sieben robusten Markergene zeigt sich, dass nur die Expression von *TNFSF4* 48 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy ähnlich zu der Expression von *TNFSF4* 48 h nach Inkubation mit 0,4 µg/ml Mitomycin C war. Die in dieser Arbeit detektierten strahlenspezifischen Expressionsprofile der Markergene für Dosisabschätzungen stimmen deshalb mit den Ergebnissen einer Studie von Park *et al.* (2002) überein. Park *et al.* (2002) identifizierten nach γ -Bestrahlung mit 4, 8 und 16 Gy 384 signifikant veränderte Gene, die anschließend auf ihre strahlenspezifische Induktion untersucht wurden. Dazu wurden T-Zellen mit den Zytostatika Doxorubicin und Cisplatin inkubiert, wodurch ebenfalls Schädigungen der DNA hervorgerufen werden (Forrest *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Dennoch war es möglich, die durch die γ -Strahlung induzierten Expressionsänderungen von den durch die Inkubation mit Doxorubicin und Cisplatin induzierten Expressionsänderungen zu unterscheiden.

Insgesamt geht aus den beschriebenen Studien und den in dieser Arbeit nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C erzielten Ergebnissen hervor, dass DNA-schädigende Substanzen zu einer Hochregulation von *FDXR*, *PHLDA3* und *TNFSF4* führen. Aus dem Vergleich der in dieser Arbeit nach Bestrahlung detektierten Expressionsmuster mit den nach

Inkubation mit 4-Acetamidophenol und Mitomycin C detektierten Expressionen aber lässt sich erkennen, dass in den sieben untersuchten Markergenen durch Bestrahlung spezifische Expressionsmuster induziert werden. Die in dieser Arbeit und von Park *et al.* (2002) erzielten Ergebnissen lassen deshalb den Schluss zu, dass die Mechanismen der zellulären Antwort auf Chemotherapeutika und Strahlung unabhängig voneinander sind (Park *et al.*, 2002) und unterstützen somit die wohlbekannten synergistischen Effekte einer kombinierten Chemo- und Strahlentherapie bei Krebserkrankungen (Green *et al.*, 2001). Die Anforderungen an Marker für biodosimetrische Applikationen bestehen darin, dass sie eine geringe interindividuelle Variabilität und eine hohe Strahlenspezifität aufweisen sollten (Pinto *et al.*, 2010). Deshalb weisen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse daraufhin, dass die nach Bestrahlung identifizierten Markergene aufgrund ihrer hohen Spezifität (Swanson, 2002) äußerst gut für biodosimetrische Applikationen nach Hochdosisbestrahlung geeignet sind.

4.6 Zelluläre und molekulare Effekte der Niedrigdosisbestrahlung in Lymphozyten

Die durch die Einwirkung geringer Dosen IR ausgelösten Effekte in Lymphozyten wurden untersucht, indem das Vollblut von sechs gesunden Spendern mit 0,02 und 0,1 Gy bestrahlt und die aus dem Vollblut isolierten Lymphozyten 24 und 48 h nach Bestrahlung in verschiedene Experimente eingesetzt wurden (siehe 3.3).

4.6.1 Apoptoserate nach Niedrigdosisbestrahlung

Zunächst wurde die Apoptoserate der Lymphozyten untersucht, wobei sich zeigte, dass der Anteil an vitalen Lymphozyten besonders 48 h nach Bestrahlungen mit 0,02 und 0,1 Gy signifikant abnahm, wohingegen der Anteil an früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten signifikant zunahm (siehe 3.3.1).

Bislang liegen keine genauen Ergebnisse über eine veränderte Apoptoserate kultivierter Lymphozyten nach Bestrahlungen unter 0,1 Gy vor. Wilkins *et al.* (2002) beobachteten jedoch einen signifikanten Anstieg der strahleninduzierten Apoptose in T-Zellen 44 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,3 Gy. Fachin *et al.* (2007) konnten bei Genexpressionsanalysen in humanen Lymphozyten bereits nach Bestrahlung mit 0,1 Gy eine signifikante Änderung des an der Kontrolle der Apoptose beteiligten Gens *BAT3* detektieren. Des Weiteren wurden Studien veröffentlicht, in denen ein Anstieg der

Chromosomenaberrationen nach Bestrahlungen im Niedrigdosisbereich detektiert wurde (Bonassi *et al.*, 1997; Iwasaki *et al.*, 2011; Milacic, 2009). Milacic (2009) verglich dabei die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen beruflicher exponierter Personen mit einer durchschnittlichen Jahresdosis von 14,5 mSv mit der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen bei Personen, die nur der natürlichen Strahlung ausgesetzt waren und eine durchschnittliche Jahresdosis von 2,8 mSv erhielten. Dabei zeigte sich, dass die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen, bezogen auf den Karyotyp von 200 Lymphozyten, bei beruflich exponierten Personen 22,5% und bei der Kontrollgruppe 2,1% betrug (Milacic, 2009).

Die beschriebenen Studien zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Apoptosemessungen weisen letztlich daraufhin, dass schon Bestrahlungen unter 0,1 Gy DNA-Schädigungen induzieren können, die ausreichend für die Einleitung der Apoptose sein können.

4.6.2 Markergene für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung

Die Intention der vorliegenden Arbeit lag weiterhin darin, Gene zu identifizieren, die durch Expressionsänderungen nach Niedrigdosisbestrahlung eine Dosisabschätzung erlauben. Dabei wurden nach Bestrahlung von Lymphozyten mit 0,02 und 0,1 Gy erstmalig neun Gene identifiziert, die *in vitro* eine Genauigkeit der Dosiszuordnung von 95,6% erlauben (Knops *et al.*, 2012; siehe 3.3.2).

Bislang liegt keine Studie vor, deren Ziel die Identifizierung von Genen für biodosimetrische Applikationen im Niedrigdosisbereich war. In einer Studie von Fachin *et al.* (2009) wurde jedoch die Genexpression *in vivo* bestrahlter Lymphozyten beruflich exponierter Personen untersucht, wobei die erhaltenen Strahlendosen von 0,696 bis 39,088 mSv reichten. Dabei konnten signifikante transkriptionelle Änderungen bei 78 Genen detektiert werden, die unter anderem in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und die Stressantwort involviert sind. Des Weiteren wurden in Genexpressionsstudien von Amundson *et al.* (2003) Dosis-Antwort-Beziehungen für fünf an der Stressantwort der Zelle beteiligte Gene nach γ -Bestrahlung von ML-1 Zellen zwischen 0,02 und 0,5 Gy detektiert. Dabei konnte eine lineare Induktion der Gene *CDKN1A*, *GADD45A* und *MDM2* nachgewiesen werden, ohne dass ein Schwellenwert für die Induktion dieser Gene ersichtlich wurde (Amundson *et al.*, 2003). Auch in einer Studie von Franco *et al.* (2005) wurden 140 Gene mit bekannter und 60 Gene

mit unbekannter Funktion identifiziert, die eine veränderte Genexpression in humanen Keratinozyten nach Bestrahlung mit 0,01 Gy aufwiesen.

Insgesamt war keines der in dieser Arbeit identifizierten Gene für die Dosiszuordnung nach Niedrigdosisbestrahlung unter den Genen, die in den beschriebenen Studien als signifikant verändert identifiziert wurden. Dennoch zeigen die Studien, dass schon nach Niedrigdosisbestrahlung veränderte Genexpressionen auftreten, die es ermöglichen, Markergene für Dosisabschätzungen zu selektieren, was in der vorliegenden Arbeit erfolgreich durchgeführt wurde.

4.6.3 QRT-PCR-basierte Validierung ausgewählter Markergene nach Niedrigdosisbestrahlung

Drei der neun für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung identifizierten Markergene, *FDXR*, *PFKFB3* und *LY6G5C*, wurden ausgewählt, um an diesen die detektierten Expressionsänderung mittels qRT-PCR-Messungen zu validieren (siehe 3.3.3). Dabei konnten besonders für *FDXR* und *PFKFB3* deutliche strahleninduzierte Änderungen der Genexpression gemessen werden.

Sehr interessant ist, dass das Gen *FDXR* sowohl in dem Genset für Dosisabschätzungen nach Hochdosisbestrahlung als auch in dem Genset für Dosisabschätzungen nach Niedrigdosisbestrahlung enthalten ist. Die Funktion des *FDXR* Proteins in den Mitochondrien besteht im Elektronentransport von NADPH über Ferredoxin zum Cytochrom P450. Des Weiteren kann *FDXR* nach Schädigung der DNA P53-abhängig induziert werden, wodurch die Zellen für eine ROS-vermittelte Apoptose sensibilisiert werden (Liu & Chen, 2002; Yu *et al.*, 2003). Da *FDXR* schon in einigen anderen Studien als strahleninduziert identifiziert wurde (Gruel *et al.*, 2008; Kabacik *et al.*, 2011; Kis *et al.*, 2006; Paul & Amundson, 2008) und auch in dieser Arbeit deutliche Änderungen der Genexpression nach Bestrahlung nachgewiesen werden konnten, scheint *FDXR* ein äußerst geeignetes Markergen für Dosisabschätzungen sowohl nach Niedrig- als auch nach Hochdosisbestrahlung zu sein. Zudem scheint dieses Gen bzw. dessen Genprodukt eine zentrale Bedeutung in der zellulären Strahlenantwort zu besitzen.

PFKFB3 hingegen ist ein Schlüsselregulator der Glykolyse (Okar & Lange, 1999) und *LY6G5C* gehört zu einem Cluster von Leukozyten-Antigen-6 Genen, die in der MHC Klasse III Region auf dem Chromosom 6 lokalisiert sind (Mallya *et al.*, 2002). Die genaue Funktion

dieses Gens und der anderen in dem aus neun Genen bestehenden Genset für Dosisabschätzungen nach Niedrigdosisbestrahlung ist bislang jedoch nicht bekannt.

Insgesamt ist die Vorhersage der Strahlendosis nach einer Niedrigdosisbestrahlung nicht notwendig, um über die einzuleitende medizinische Versorgung der betroffenen Person zu entscheiden, da deterministische Strahlenschäden erst ab Bestrahlungen von 0,5 Gy auftreten. Die Risiken einer Niedrigdosisbestrahlung aber werden derzeit durch das LNT-Modell abgeschätzt (Bogdandi *et al.*, 2010), das auf einer Hochrechnung der Daten von Personen basiert, die mit hohen Dosen bestrahlt wurden (Jin *et al.*, 2008). Dabei sagt das LNT-Modell aus, dass durch Niedrigdosisbestrahlungen stochastische Strahlenschäden auftreten und es deshalb wünschenswert ist, auch unfallbedingte Niedrigdosisbestrahlungen festzustellen und deren Höhe abschätzen zu können. Abschätzungen der individuellen Dosis nach Niedrigdosisbestrahlung, beispielsweise durch veränderte Genexpressionen, wären hilfreich, um die Langzeitfolgen einer Niedrigdosisbestrahlung besser einschätzen und die aus einer Niedrigdosisbestrahlung resultierenden Nebenwirkungen besser abschätzen zu können (Dressman *et al.*, 2007). Zudem können diese Ergebnisse Anhaltspunkte darüber geben, welche Signalwege bei Niedrigdosisbestrahlungen aktiviert werden, um hierüber zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Niedrigdosisbestrahlung zu gelangen.

5 Zusammenfassung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Genexpressionsänderungen in humanen Lymphozyten nach Bestrahlung zu untersuchen und letztlich Gene zu identifizieren, die für biodosimetrische Applikationen im Niedrig- und Hochdosisbereich geeignet sind und eine schnelle und zuverlässige Abschätzung der individuellen Strahlendosis erlauben. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

- Auf der Basis von *Microarray*-Daten wurden in Signalweganalysen der hochdosisbestrahlten Lymphozyten der P53-Signalweg, die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion, der Zellzyklus, der Systemische Lupus erythematoses Signalweg und die Antigenprozessierung und –präsentation als überrepräsentiert identifiziert.
- Für eine Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung wurden 16 Gene identifiziert, die mit einer Sensitivität von 95,7% und einer Spezifität von 98,9% eine Abschätzung der jeweiligen Strahlendosis erlauben.
- Es erfolgte zudem eine Validierung der Genexpressionsänderungen von sieben ausgewählten Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung an gepoolten und nicht-gepoolten Proben von sechs Spendern mittels qRT-PCR.
- Es konnte keine Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge nach Hochdosisbestrahlung und kein beschleunigter Proteinabbau von ausgewählten Proteinen nach Hochdosisbestrahlung beobachtet werden.
- Nach Inkubation mit Mitomycin C konnten in den robusten Markergenen für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung Genexpressionsänderungen detektiert werden.
- Für eine Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung wurden neun Gene identifiziert, die mit einer Sensitivität von 95,6% und einer Spezifität von 97,8% eine Abschätzung der jeweiligen Strahlendosis erlauben.
- Es erfolgte zudem eine Validierung der Genexpressionsänderungen von drei ausgewählten Markergenen für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung an Einzelspenderproben.

Insgesamt konnte das Hauptziel dieser Arbeit, die Identifizierung von Markergenen für Dosisabschätzungen nach Hoch- und Niedrigdosisbestrahlungen, erreicht werden, wobei Markergene identifiziert wurden, die geringe interindividuelle Genexpressionsunterschiede

aufweisen und zudem strahlenspezifisch induziert werden. Erstmalig konnte eine Niedrigdosissignatur identifiziert werden, die mit hoher Sensitivität und Spezifität eine korrekte Abschätzung bei 0,02 und 0,1 Gy erlaubt.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Markergene zu identifizieren, die *in vitro* für Dosisabschätzungen nach Hoch- und Niedrigdosisbestrahlung geeignet sind. Um letztlich die *in vivo* Anwendbarkeit der identifizierten Markergene überprüfen zu können, müssten in einem nächsten Schritt zwei verschiedene Sets an *customized Microarrays* synthetisiert werden, die entweder die 16 Markergene für die Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung oder die neun Markergene für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung kodieren. Für die Überprüfung der *in vivo* Anwendbarkeit der identifizierten Markergene nach Hochdosisbestrahlung müsste idealerweise Blut von ganzkörperbestrahlten Personen vor einer Stammzelltransplantation gewonnen werden, da diese mit Einzeldosen von ca. 2 Gy bestrahlt werden. Aus dem Blut müssten schließlich die Lymphozyten und aus diesen die RNA isoliert werden, welche für Genexpressionsanalysen auf die *customized Microarrays* aufgetragen wird. Somit könnte die Genexpression der 16 für die nach Hochdosisbestrahlung identifizierten Markergene *in vivo* verifiziert werden.

Die *in vivo* Anwendbarkeit der neun für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung identifizierten Markergene hingegen könnte an Blut von Personen, die sich einer computertomographischen Untersuchung unterziehen mussten, untersucht werden, da dabei Strahlendosen von bis zu 0,02 Gy erreicht werden. Aus dem Blut der Personen müssten wiederum die Lymphozyten und aus diesen die RNA isoliert werden, welche dann für Genexpressionsanalysen auf die *customized Microarrays*, welche die neun Markergene für die Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung kodieren, aufgetragen würde. Somit könnte auch die *in vivo* Genexpression der neun für die nach Niedrigdosisbestrahlung identifizierten Markergene kontrolliert werden

7 Literaturverzeichnis

- Ainsbury, E. A. & Barquinero, J. F. (2009).** Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation. Statistical and computational aspects. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* **45**, 307-312.
- Al-Awadhi, A. M., Alfadhli, S. M., Al-Khaldi, D., Borhama, M. & Borusly, M. (2010).** Investigation of the distribution of lymphocyte subsets and zinc levels in multitransfused beta-thalassemia major patients. *International journal of laboratory hematology* **32**, 191-196.
- Allende-Vega, N. & Saville, M. K. (2010).** Targeting the ubiquitin-proteasome system to activate wild-type p53 for cancer therapy. *Seminars in cancer biology* **20**, 29-39.
- Amundson, S. A., Do, K. T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. & Fornace, A. J., Jr. (2000).** Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiation research* **154**, 342-346.
- Amundson, S. A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. & Fornace, A. J., Jr. (2001a).** Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans. *Expert Rev Mol Diagn* **1**, 211-219.
- Amundson, S. A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. & Fornace, A. J., Jr. (2001b).** Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation. *Radiation research* **156**, 657-661.
- Amundson, S. A., Lee, R. A., Koch-Paiz, C. A., Bittner, M. L., Meltzer, P., Trent, J. M. & Fornace, A. J., Jr. (2003).** Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 445-452.
- Amundson, S. A., Do, K. T., Vinikoor, L., Koch-Paiz, C. A., Bittner, M. L., Trent, J. M., Meltzer, P. & Fornace, A. J., Jr. (2005).** Stress-specific signatures: expression profiling of p53 wild-type and -null human cells. *Oncogene* **24**, 4572-4579.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998).** Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Attardi, L. D., Reczek, E. E., Cosmas, C., Demicco, E. G., McCurrach, M. E., Lowe, S. W. & Jacks, T. (2000).** PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes & development* **14**, 704-718.
- Bae, I., Fan, S., Bhatia, K., Kohn, K. W., Fornace, A. J., Jr. & O'Connor, P. M. (1995).** Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer research* **55**, 2387-2393.
- Bartek, J. & Lukas, J. (2001).** Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current opinion in cell biology* **13**, 738-747.

- Bauchinger, M., Schmid, E., Rimpl, G. & Kühn, H. (1975).** Chromosome aberrations in human lymphocytes after irradiation with 15.0-MeV neutrons *in vitro*. I. Dose-response relation and RBE. *Mutation Research* **27**, 103-109.
- Belloni, P., Meschini, R., Czene, S., Harms-Ringdahl, M. & Palitti, F. (2005).** Studies on radiation-induced apoptosis in G0 human lymphocytes. *International journal of radiation biology* **81**, 587-599.
- Bieging, K. T. & Attardi, L. D. (2012).** Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in cell biology* **22**, 97-106.
- Boes, M., Stoppelenburg, A. J. & Sille, F. C. (2009).** Endosomal processing for antigen presentation mediated by CD1 and Class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction. *Immunology* **127**, 163-170.
- Bogdandi, E. N., Balogh, A., Felgyinszki, N., Szatmari, T., Persa, E., Hildebrandt, G., Safrany, G. & Lumniczky, K. (2010).** Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiation research* **174**, 480-489.
- Boldt, S., Knops, K., Kriehuber, R. & Wolkenhauer, O. (2012).** A frequency-based gene selection method to identify robust biomarkers for radiation dose prediction. *International journal of radiation biology* **88**, 267-276.
- Bolus, N. E. (2001).** Basic review of radiation biology and terminology. *Journal of nuclear medicine technology* **29**, 67-73; test 76-67.
- Bonassi, S., Forni, A., Bigatti, P. & other authors (1997).** Chromosome aberrations in hospital workers: evidence from surveillance studies in Italy (1963-1993). *Am J Ind Med* **31**, 353-360.
- Bornstein, C., Brosh, R., Molchadsky, A. & other authors (2011).** SPATA18, a spermatogenesis-associated gene, is a novel transcriptional target of p53 and p63. *Molecular and cellular biology* **31**, 1679-1689.
- Borras, C., Gomez-Cabrera, M. C. & Vina, J. (2011).** The dual role of p53: DNA protection and antioxidant. *Free radical research* **45**, 643-652.
- Boulares, A. H., Zoltoski, A. J., Stoica, B. A., Cuvillier, O. & Smulson, M. E. (2002).** Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-XL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacology & toxicology* **90**, 38-50.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Breen, A. P. & Murphy, J. A. (1995).** Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine* **18**, 1033-1077.
- Brengues, M., Paap, B., Bittner, M., Amundson, S., Seligmann, B., Korn, R., Lenigk, R. & Zenhausern, F. (2010).** Biodosimetry on small blood volume using gene expression assay. *Health physics* **98**, 179-185.

- Burns, T. F. & El-Deiry, W. S. (1999).** The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular physiology* **181**, 231-239.
- Campa, A., Ballarini, F., Belli, M. & other authors (2005).** DNA DSB induced in human cells by charged particles and gamma rays: experimental results and theoretical approaches. *International journal of radiation biology* **81**, 841-854.
- Chambers, K. A., Harrington, N. P., Ross, W. M. & Fillion, L. G. (1998).** Relative alterations in blood mononuclear cell populations reflect radiation injury in mice. *Cytometry* **31**, 45-52.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1999).** 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-620.
- Chaudhry, M. A. (2008).** Biomarkers for human radiation exposure. *Journal of biomedical science* **15**, 557-563.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T. D. (2000).** Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes & development* **14**, 278-288.
- Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C. & other authors (2002).** Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1**, 304-313.
- Chiriva-Internati, M., Grizzi, F., Pinkston, J., Morrow, K. J., D'Cunha, N., Frezza, E. E., Muzzio, P. C., Kast, W. M. & Cobos, E. (2006).** Gamma-radiation upregulates MHC class I/II and ICAM-I molecules in multiple myeloma cell lines and primary tumors. *In vitro cellular & developmental biology Animal* **42**, 89-95.
- Choudhury, A., Cuddihy, A. & Bristow, R. G. (2006).** Radiation and new molecular agents part I: targeting ATM-ATR checkpoints, DNA repair, and the proteasome. *Seminars in radiation oncology* **16**, 51-58.
- Cobb, L. J., Salih, D. A., Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E. J., Lovett, F., Holding, C. & Pell, J. M. (2004).** Partitioning of IGFBP-5 actions in myogenesis: IGF-independent anti-apoptotic function. *Journal of cell science* **117**, 1737-1746.
- Cobrinik, D. (2005).** Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796-2809.
- Crompton, N. E. & Ozsahin, M. (1997).** A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood leukocytes based on DNA and surface-marker assessment of cytotoxicity. *Radiation research* **147**, 55-60.
- Dainiak, N. (2002).** Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Experimental hematology* **30**, 513-528.
- Dehos, A., Kriehuber, R., Czempel, H., Baumgartner, I., Egblomassé, C., Burkart W. (1994).** Changes in subpopulation of lymphocytes after exposure to ionizing radiation in vitro and in vivo, in „Low Level Radiation and Living State”. Edts. Huilgol, N. G., Gopinath, D. V., Singh, B. B., Narosa Publishing House: 102-108.

- Dhariwala, F. A., Narang, H. & Krishna, M. (2012).** Ionizing radiation induced signaling of DNA damage response molecules in RAW 264.7 and CD4(+) T cells. *Molecular and cellular biochemistry* **363**, 43-51.
- Di, J., Zhang, Y. & Zheng, J. (2011).** Reactivation of p53 by inhibiting Mdm2 E3 ligase: a novel antitumor approach. *Current cancer drug targets* **11**, 987-994.
- Dressman, H. K., Muramoto, G. G., Chao, N. J., Meadows, S., Marshall, D., Ginsburg, G. S., Nevins, J. R. & Chute, J. P. (2007).** Gene expression signatures that predict radiation exposure in mice and humans. *PLoS Med* **4**, e106.
- Du, R., Huang, C., Bi, Q., Zhai, Y., Xia, L., Liu, J., Sun, S. & Fan, D. (2010a).** URG11 mediates hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition by modulation of E-cadherin and beta-catenin. *Biochemical and biophysical research communications* **391**, 135-141.
- Du, R., Xia, L., Sun, S. & other authors (2010b).** URG11 promotes gastric cancer growth and invasion by activation of beta-catenin signalling pathway. *J Cell Mol Med* **14**, 621-635.
- Dunkle, A. & He, Y. W. (2011).** Apoptosis and autophagy in the regulation of T lymphocyte function. *Immunologic research* **49**, 70-86.
- Dunn, S. D. (1986).** Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**, 144-153.
- Eby, K. G., Rosenbluth, J. M., Mays, D. J., Marshall, C. B., Barton, C. E., Sinha, S., Johnson, K. N., Tang, L. & Pietenpol, J. A. (2010).** ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Molecular cancer* **9**, 95.
- El-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M. & other authors (1994).** WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer research* **54**, 1169-1174.
- Eliassen, K. A., Baldwin, A., Sikorski, E. M. & Hurt, M. M. (1998).** Role for a YY1-binding element in replication-dependent mouse histone gene expression. *Molecular and cellular biology* **18**, 7106-7118.
- Erasmus, W. L., Slabbert, J. P., Crompton, N. & Meehan, K. A. (2005).** The leukocyte apoptosis assay: a clinical predictor of radiosensitivity. *Medical Technology SA* **19**, 9-11.
- Evans, H. J. & Vijayalaxmi (1980).** Storage enhances chromosome damage after exposure of human leukocytes to mitomycin C. *Nature* **284**, 370-372.
- Facchino, S., Abdouh, M., Chatoo, W. & Bernier, G. (2010).** BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 10096-10111.
- Fachin, A. L., Mello, S. S., Sandrin-Garcia, P., Junta, C. M., Donadi, E. A., Passos, G. A. & Sakamoto-Hojo, E. T. (2007).** Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays. *Radiation research* **168**, 650-665.

- Fachin, A. L., Mello, S. S., Sandrin-Garcia, P., Junta, C. M., Ghilardi-Netto, T., Donadi, E. A., Passos, G. A. & Sakamoto-Hojo, E. T. (2009).** Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *Journal of radiation research* **50**, 61-71.
- Fei, P. & El-Deiry, W. S. (2003).** P53 and radiation responses. *Oncogene* **22**, 5774-5783.
- Feinendegen, L., Hahn, K., Löcker, H., Müller, H., Paretzke, H. G., Reiners, C., Rühm, W., Schneider, R. & Zach, C. (2006).** Radioaktivität, Röntgenstrahlung und Gesundheit. *Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz*, Buch.
- Fenech, M. (2006).** Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation research* **600**, 58-66.
- Ferguson, A. T., Evron, E., Umbricht, C. B. & other authors (2000).** High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6049-6054.
- Ferro, M., Giuberti, G., Zappavigna, S. & other authors (2012).** Chondroitin sulphate enhances the antitumor activity of gemcitabine and mitomycin-C in bladder cancer cells with different mechanisms. *Oncology reports* **27**, 409-415.
- Fischer, T., Sudbrock, F., Pomplun, E. & other authors (2012).** Cellular response on Auger- and Beta-emitting nuclides: Human embryonic stem cells (hESC) vs. keratinocytes. *Int J Radiat Biol.*
- Flood, A. B., Nicolalde, R. J., Demidenko, E., Williams, B. B., Shapiro, A., Wiley, A. L., Jr. & Swartz, H. M. (2011).** A Framework for Comparative Evaluation of Dosimetric Methods to Triage a Large Population Following a Radiological Event. *Radiation measurements* **46**, 916-922.
- Forrest, R. A., Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Kimura, K., Phillips, D. R. & Cutts, S. M. (2012).** Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochemical pharmacology* **83**, 1602-1612.
- Franco, N., Lamartine, J., Frouin, V., Le Minter, P., Petat, C., Leplat, J. J., Libert, F., Gidrol, X. & Martin, M. T. (2005).** Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiation research* **163**, 623-635.
- Fringer, J. & Grinnell, F. (2003).** Fibroblast quiescence in floating collagen matrices: decrease in serum activation of MEK and Raf but not Ras. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20612-20617.
- Garty, G., Chen, Y., Salerno, A. & other authors (2010).** The RABIT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. *Health physics* **98**, 209-217.
- Ghardi, M., Moreels, M., Chatelain, B., Chatelain, C. & Baatout, S. (2012).** Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. *International journal of molecular medicine* **29**, 769-780.

- Ghosh, B. & Bose, I. (2006).** Gene copy number and cell cycle arrest. *Physical biology* **3**, 29-36.
- Giacinti, C. & Giordano, A. (2006).** RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220-5227.
- Giri, A. K. (1993).** The genetic toxicology of paracetamol and aspirin: a review. *Mutation research* **296**, 199-210.
- Goodhead, D. T. (1994).** Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology* **65**, 7-17.
- Green, D. R. & Reed, J. C. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Green, D. R., Droin, N. & Pinkoski, M. (2003).** Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews* **193**, 70-81.
- Green, D. R. & Chipuk, J. E. (2006).** p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* **126**, 30-32.
- Green, J. A., Kirwan, J. M., Tierney, J. F., Symonds, P., Fresco, L., Collingwood, M. & Williams, C. J. (2001).** Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **358**, 781-786.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. & Gerstein, M. (2003).** Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology* **4**, 117.
- Griffey, R. T. & Sodickson, A. (2009).** Cumulative radiation exposure and cancer risk estimates in emergency department patients undergoing repeat or multiple CT. *AJR Am J Roentgenol* **192**, 887-92.
- Gröger, M. (2007).** Einfluss einer Beatmung mit 100% Sauerstoff auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und die Parameter des oxidativen Stress im Langzeitmodell des septischen Schocks beim Schwein. *Doktorarbeit*.
- Gruel, G., Voisin, P., Vaurijoux, A., Roch-Lefevre, S., Gregoire, E., Maltere, P., Petat, C., Gidrol, X. & Roy, L. (2008).** Broad modulation of gene expression in CD4+ lymphocyte subpopulations in response to low doses of ionizing radiation. *Radiation research* **170**, 335-344.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. (1999).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* **19**, 1720-1730.
- Hada, M. & Georgakilas, A. G. (2008).** Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *Journal of radiation research* **49**, 203-210.
- Hall, E. J. (2000).** Radiobiology for the radiologist. *Lippincott Williams and Wilkins*, Buch.
- Halliwell, B. & Aruoma, O. I. (1991).** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters* **281**, 9-19.

- Hamm, J. (2000).** Acute acetaminophen overdose in adolescents and adults. *Critical care nurse* **20**, 69-74.
- Harrington, N. P., Chambers, K. A., Ross, W. M. & Fillion, L. G. (1997).** Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations. *Clinical and experimental immunology* **107**, 417-424.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. (2003).** Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science* **116**, 4077-4085.
- Hauser, S. H., Calorini, L., Wazer, D. E. & Gattoni-Celli, S. (1993).** Radiation-enhanced expression of major histocompatibility complex class I antigen H-2Db in B16 melanoma cells. *Cancer research* **53**, 1952-1955.
- Herodin, F. & Drouet, M. (2005).** Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches. *Experimental hematology* **33**, 1071-1080.
- Hiom, K. (2010).** Coping with DNA double strand breaks. *DNA repair* **9**, 1256-1263.
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J. & Mak, T. W. (2000).** DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-1827.
- Hoffman, B. & Liebermann, D. A. (2007).** Role of gadd45 in myeloid cells in response to hematopoietic stress. *Blood cells, molecules & diseases* **39**, 344-347.
- Hoffmann, W. & Schmitz-Feuerhake, I. (1999).** How radiation-specific is the dicentric assay? *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* **9**, 113-133.
- Hongslo, J. K. & Holme, J. A. (1994).** [DNA damages caused by paracetamol]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* **114**, 1204-1206.
- Hosokawa, Y., Tanaka, L., Kaneko, M., Sakakura, Y., Tsuruga, E., Irie, K. & Yajima, T. (2002).** Apoptosis induced by generated OH radicals inside cells after irradiation. *Archives of histology and cytology* **65**, 301-305.
- Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. (2009).** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57.
- Huang, T. G., Ip, S. M., Yeung, W. S. & Ngan, H. Y. (2001).** Mitomycin C and cisplatin enhanced the antitumor activity of p53-expressing adenovirus in cervical cancer cells. *Cancer investigation* **19**, 360-368.
- Huda, W. & Ogden, K. M. (2008).** Comparison of head and body organ doses in CT. *Phys Med Biol* **53**, N9-N14.
- Hutchinson, F. (1985).** Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **32**, 115-154.

- Hwang, P. M., Bunz, F., Yu, J. & other authors (2001).** Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nature medicine* **7**, 1111-1117.
- Ibrulj, S., Rahmanovic, A., Haveric, S., Haveric, A. & Pasic, A. D. (2007).** Cytogenetic evaluation of paracetamol effects in human lymphocytes culture. *Drug Chem Toxicol* **30**, 133-143.
- Iwasaki, T., Takashima, Y., Suzuki, T., Yoshida, M. A. & Hayata, I. (2011).** The dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low-dose gamma rays. *Radiation research* **175**, 208-213.
- Jackson, S. P. (2002).** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**, 687-696.
- Jeggo, P. A. & Lobrich, M. (2006).** Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA repair* **5**, 1192-1198.
- Jen, K. Y. & Cheung, V. G. (2003).** Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Genome Res* **13**, 2092-2100.
- Jen, K. Y. & Cheung, V. G. (2005).** Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer research* **65**, 7666-7673.
- Jin, S. & Levine, A. J. (2001).** The p53 functional circuit. *Journal of cell science* **114**, 4139-4140.
- Jin, Y. W., Na, Y. J., Lee, Y. J. & other authors (2008).** Comprehensive analysis of time- and dose-dependent patterns of gene expression in a human mesenchymal stem cell line exposed to low-dose ionizing radiation. *Oncology reports* **19**, 135-144.
- Kabacik, S., Mackay, A., Tamber, N., Manning, G., Finnon, P., Paillier, F., Ashworth, A., Bouffler, S. & Badie, C. (2011).** Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *International journal of radiation biology* **87**, 115-129.
- Kahmann, L., Beyer, U., Mehlhorn, G., Thiel, F. C., Strnad, V., Fasching, P. A. & Lux, M. P. (2010).** Mitomycin C in patients with gynecological malignancies. *Onkologie* **33**, 547-557.
- Kanehisa, M. & Goto, S. (2000).** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**, 27-30.
- Kang, C. M., Park, K. P., Song, J. E., Jeoung, D. I., Cho, C. K., Kim, T. H., Bae, S., Lee, S. J. & Lee, Y. S. (2003).** Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. *Radiation research* **159**, 312-319.
- Kantari, C. & Walczak, H. (2011).** Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 558-563.

- Kawase, T., Ichikawa, H., Ohta, T., Nozaki, N., Tashiro, F., Ohki, R. & Taya, Y. (2008).** p53 target gene AEN is a nuclear exonuclease required for p53-dependent apoptosis. *Oncogene* **27**, 3797-3810.
- Kawase, T., Ohki, R., Shibata, T. & other authors (2009).** PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* **136**, 535-550.
- Kendzierski, C. M., Zhang, Y., Lan, H. & Attie, A. D. (2003).** The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics* **4**, 465-477.
- Kerley-Hamilton, J. S., Pike, A. M., Li, N., DiRenzo, J. & Spinella, M. J. (2005).** A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. *Oncogene* **24**, 6090-6100.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239-257.
- Khan, F., Sherwani, A. F. & Afzal, M. (2009).** Chromosomal aberration and micronucleus studies of two topoisomerase (II) targeting anthracyclines. *J Environ Biol* **30**, 409-412.
- Khanna, K. K. & Jackson, S. P. (2001).** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics* **27**, 247-254.
- Kiefer, J. & Kiefer, I. (2003).** Allgemeine Radiologie. *Parey Buchverlag*, Buch.
- Kimura, K. & Gelmann, E. P. (2000).** Tumor necrosis factor-alpha and Fas activate complementary Fas-associated death domain-dependent pathways that enhance apoptosis induced by gamma-irradiation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 8610-8617.
- Kinsella, T. J. (2009).** Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 1853-1859.
- Kis, E., Szatmari, T., Keszei, M., Farkas, R., Esik, O., Lumniczky, K., Falus, A. & Safrany, G. (2006).** Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **66**, 1506-1514.
- Klymenko, S. V., Belyi, D. A., Ross, J. R. & other authors (2011).** Hematopoietic cell infusion for the treatment of nuclear disaster victims: new data from the Chernobyl accident. *International journal of radiation biology* **87**, 846-850.
- Knops, K., Boldt, S., Wolkenhauer, O. & Kriehuber, R. (2012).** Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry. *Radiation Research*, accepted.
- Koarada, S. & Tada, Y. (2012).** RP105-negative B cells in systemic lupus erythematosus. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 259186.

- Kondo, K., Okuma, K., Tanaka, R., Matsuzaki, G., Ansari, A. A. & Tanaka, Y. (2008).** Rapid induction of OX40 ligand on primary T cells activated under DNA-damaging conditions. *Hum Immunol* **69**, 533-542.
- Kusakabe, H., Takahashi, T. & Tanaka, N. (1999).** Chromosome-type aberrations induced in chromosome 9 after treatment of human peripheral blood lymphocytes with mitomycin C at the G(0) phase. *Cytogenet Cell Genet* **85**, 212-216.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lau, S. K., Weiss, L. M. & Chu, P. G. (2010).** TCL1 protein expression in testicular germ cell tumors. *American journal of clinical pathology* **133**, 762-766.
- Le Guezennec, X. & Bulavin, D. V. (2010).** WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends in biochemical sciences* **35**, 109-114.
- Lee, M. H. & Lozano, G. (2006).** Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins. *Seminars in cancer biology* **16**, 225-234.
- Leonard, A., Rueff, J., Gerber, G. B. & Leonard, E. D. (2005).** Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiation protection dosimetry* **115**, 448-454.
- Lian, Z., Liu, J., Li, L. & other authors (2006).** Enhanced cell survival of Hep3B cells by the hepatitis B x antigen effector, URG11, is associated with upregulation of beta-catenin. *Hepatology* **43**, 415-424.
- Lichtinghagen, R., Musholt, P. B., Lein, M. & other authors (2002).** Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *European urology* **42**, 398-406.
- Liu, F., Kuo, W. P., Jenssen, T. K. & Hovig, E. (2012).** Performance comparison of multiple microarray platforms for gene expression profiling. *Methods Mol Biol* **802**, 141-155.
- Liu, G. & Chen, X. (2002).** The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* **21**, 7195-7204.
- Loppnow, H. (2001).** [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. *Der Internist* **42**, 13-14, 17-27.
- Louagie, H., Van Eijkeren, M., Philippe, J., Thierens, H. & de Ridder, L. (1999).** Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *International journal of radiation biology* **75**, 767-771.
- Lu, T. P., Lai, L. C., Lin, B. I. & other authors (2010).** Distinct signaling pathways after higher or lower doses of radiation in three closely related human lymphoblast cell lines. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **76**, 212-219.

- Mallya, M., Campbell, R. D. & Aguado, B. (2002).** Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms. *Genomics* **80**, 113-123.
- Martin, L. J., Chen, K. & Liu, Z. (2005).** Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 6449-6459.
- Matsumoto, H., Hamada, N., Takahashi, A., Kobayashi, Y. & Ohnishi, T. (2007).** Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *Journal of radiation research* **48**, 97-106.
- Mayer, C., Popanda, O., Zelezny, O., von Brevern, M. C., Bach, A., Bartsch, H. & Schmezer, P. (2002).** DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA repair* **1**, 237-250.
- Meador, J. A., Ghandhi, S. A. & Amundson, S. A. (2011).** p53-Independent Downregulation of Histone Gene Expression in Human Cell Lines by High- and Low-LET Radiation. *Radiation research* **175**, 689-699.
- Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477-488.
- Meulmeester, E., Pereg, Y., Shiloh, Y. & Jochemsen, A. G. (2005).** ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle* **4**, 1166-1170.
- Milacic, S. (2009).** Chromosomal aberrations after exposure to low doses of ionizing radiation. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology* **14**, 641-646.
- Mitchison, N. A. & Wedderburn, L. R. (2000).** B cells in autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8750-8751.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. & Reed, J. C. (1994).** Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
- Miyashita, T. & Reed, J. C. (1995).** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
- Moll, U. M. & Petrenko, O. (2003).** The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 1001-1008.
- Mori, M., Benotmane, M. A., Tirone, I., Hooghe-Peters, E. L. & Desaintes, C. (2005).** Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 1489-1501.
- Mosse, I., Kostrova, L., Subbot, S., Maksimenya, I. & Molophei, V. (2000).** Melanin decreases clastogenic effects of ionizing radiation in human and mouse somatic cells and modifies the radioadaptive response. *Radiation and environmental biophysics* **39**, 47-52.

- Mullenders, L., Atkinson, M., Paretzke, H., Sabatier, L. & Bouffler, S. (2009).** Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat Rev Cancer* **9**, 596-604.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D. & other authors (1998).** p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2033-2045.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000).** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058.
- Okar, D. A. & Lange, A. J. (1999).** Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors* **10**, 1-14.
- Olive, P. L. (1998).** The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiation research* **150**, S42-51.
- Osley, M. A. (1991).** The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annual review of biochemistry* **60**, 827-861.
- Pandey, B. N., Kumar, A., Tiwari, P. & Mishra, K. P. (2010).** Radiobiological basis in management of accidental radiation exposure. *International journal of radiation biology* **86**, 613-635.
- Park, W. Y., Hwang, C. I., Im, C. N. & other authors (2002).** Identification of radiation-specific responses from gene expression profile. *Oncogene* **21**, 8521-8528.
- Pascal, L. E., True, L. D., Campbell, D. S., Deutsch, E. W., Risk, M., Coleman, I. M., Eichner, L. J., Nelson, P. S. & Liu, A. Y. (2008).** Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics* **9**, 246.
- Paul, S. & Amundson, S. A. (2008).** Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **71**, 1236-1244.
- Paul, S., Barker, C. A., Turner, H. C., McLane, A., Wolden, S. L. & Amundson, S. A. (2011).** Prediction of in vivo radiation dose status in radiotherapy patients using ex vivo and in vivo gene expression signatures. *Radiation research* **175**, 257-265.
- Pellmar, T. C. & Rockwell, S. (2005).** Priority list of research areas for radiological nuclear threat countermeasures. *Radiation research* **163**, 115-123.
- Peng, X., Wood, C. L., Blalock, E. M., Chen, K. C., Landfield, P. W. & Stromberg, A. J. (2003).** Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **4**, 26.
- Peters, E. H., Rojas-Caro, S., Brigell, M. G. & other authors (2007).** Quality-controlled measurement methods for quantification of variations in transcript abundance in whole blood samples from healthy volunteers. *Clinical chemistry* **53**, 1030-1037.

- Philippe, J., Louagie, H., Thierens, H., Vral, A., Cornelissen, M. & De Ridder, L. (1997).** Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry* **29**, 242-249.
- Pietsch, E. C., Perchiniak, E., Canutescu, A. A., Wang, G., Dunbrack, R. L. & Murphy, M. E. (2008).** Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *The Journal of biological chemistry* **283**, 21294-21304.
- Pinto, M. M., Santos, N. F. & Amaral, A. (2010).** Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiation and environmental biophysics* **49**, 567-581.
- Pirnia, F., Schneider, E., Betticher, D. C. & Borner, M. M. (2002).** Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell death and differentiation* **9**, 905-914.
- Pogosova-Agadjanyan, E. L., Fan, W., Georges, G. E. & other authors (2011).** Identification of radiation-induced expression changes in nonimmortalized human T cells. *Radiation research* **175**, 172-184.
- Port, M., Boltze, C., Wang, Y., Roper, B., Meineke, V. & Abend, M. (2007).** A radiation-induced gene signature distinguishes post-Chernobyl from sporadic papillary thyroid cancers. *Radiation research* **168**, 639-649.
- Poulsen, L., Soe, M. J., Moller, L. B. & Dufva, M. (2011).** Investigation of parameters that affect the success rate of microarray-based allele-specific hybridization assays. *PloS one* **6**, e14777.
- Pujol, M., Puig, R., Caballin, M. R., Barrios, L. & Barquinero, J. F. (2012).** The use of caffeine to assess high dose exposures to ionising radiation by dicentric analysis. *Radiation protection dosimetry* **149**, 392-398.
- Rajalingam, R. (2011).** Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *The Korean journal of hematology* **46**, 216-228.
- Rannug, U., Holme, J. A., Hongslo, J. K. & Sram, R. (1995).** International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. *Mutation research* **327**, 179-200.
- Reczek, E. E., Flores, E. R., Tsay, A. S., Attardi, L. D. & Jacks, T. (2003).** Multiple response elements and differential p53 binding control Perp expression during apoptosis. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 1048-1057.
- Rehakova, Z., Sinkora, J., Vlkova, M., Vokurkova, D., Osterreicher, J., Vavrova, J. & Driak, D. (2008).** CD27(+) peripheral blood B-cells are a useful biodosimetric marker in vitro. *Physiol Res* **57**, 589-600.
- Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. (2012).** The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in genetics : TIG* **28**, 128-136.
- Rich, T., Allen, R. L. & Wyllie, A. H. (2000).** Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777-783.

- Rockett, J. C. & Hellmann, G. M. (2004).** Confirming microarray data--is it really necessary? *Genomics* **83**, 541-549.
- Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N. & Guillouzo, A. (2012).** Interindividual Variability in Gene Expression Profiles in Human Hepatocytes and Comparison with HepaRG Cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 151-158.
- Romm, H., Wilkins, R. C., Coleman, C. N. & other authors (2011).** Biological dosimetry by the triage dicentric chromosome assay: potential implications for treatment of acute radiation syndrome in radiological mass casualties. *Radiation research* **175**, 397-404.
- Roos, W. P. & Kaina, B. (2006).** DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine* **12**, 440-450.
- Ruppova, K., Wsolova, L., Sedlak, J., Horvathova, M. & Urbancikova, M. (1999).** Detection of apoptotic changes in HeLa cells after treatment with paracetamol and sodium fluoride. *General physiology and biophysics* **18 Spec No**, 140-146.
- Rutishauser, R. L. & Kaech, S. M. (2010).** Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation. *Immunological reviews* **235**, 219-233.
- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X. & Choi, A. M. (2007).** Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* **9**, 49-89.
- Saha, A., Tiwary, A. S. & Mukherjee, A. K. (2008).** Charge transfer interaction of 4-acetamidophenol (paracetamol) with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone: a study in aqueous ethanol medium by UV-vis spectroscopic and DFT methods. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **71**, 835-840.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saini, D., Shelke, S., Mani Vannan, A., Toprani, S., Jain, V., Das, B. & Seshadri, M. (2012).** Transcription profile of DNA damage response genes at G(0) lymphocytes exposed to gamma radiation. *Molecular and cellular biochemistry* **364**, 271-281.
- Salminen, A. & Kaarniranta, K. (2011).** Control of p53 and NF-kappaB signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging. *Cellular signalling* **23**, 747-752.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Schlemmer, B. O., Sorensen, B. S., Overgaard, J., Olsen, K. E., Gjerdrum, L. M. & Nexø, E. (2004).** Quantitative PCR--new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **64**, 511-522.

- Schmitz, A., Bayer, J., Dechamps, N. & Thomas, G. (2003).** Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **57**, 769-778.
- Sheikh, M. S., Hollander, M. C. & Fornance, A. J., Jr. (2000).** Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochemical pharmacology* **59**, 43-45.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. (2000).** The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & development* **14**, 289-300.
- Shih, J. H., Michalowska, A. M., Dobbin, K., Ye, Y., Qiu, T. H. & Green, J. E. (2004).** Effects of pooling mRNA in microarray class comparisons. *Bioinformatics* **20**, 3318-3325.
- Sijts, E. J. & Kloetzel, P. M. (2011).** The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**, 1491-1502.
- Simon, S. L., Bouville, A. & Kleinerman, R. (2010).** Current use and future needs of biodosimetry in studies of long-term health risk following radiation exposure. *Health physics* **98**, 109-117.
- Simkó, M., Kriehuber, R., Lange, S. (1998).** Micronucleus formation in human amnion cells after exposure to 50 Hz MF applied horizontally and vertically. *Mutation Research* **418**, 101-111.
- Smith, L. E., Nagar, S., Kim, G. J. & Morgan, W. F. (2003).** Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. *Health physics* **85**, 23-29.
- Snippert, H. J., Haegebarth, A., Kasper, M. & other authors (2010).** Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science* **327**, 1385-1389.
- Steinstrasser, A. & Kemmer, W. (1981).** Biophysical investigations of the dose-effect relationship in chromosome aberrations of human lymphocytes caused by thorotrast deposits. II. Biological and medical aspects. *Radiation and environmental biophysics* **19**, 17-28.
- Stocker, M. E. & Montgomery, J. E. (2001).** Serum paracetamol concentrations in adult volunteers following rectal administration. *British journal of anaesthesia* **87**, 638-640.
- Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. (2009).** The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180-192.
- Su, C., Gao, G., Schneider, S., Helt, C., Weiss, C., O'Reilly, M. A., Bohmann, D. & Zhao, J. (2004).** DNA damage induces downregulation of histone gene expression through the G1 checkpoint pathway. *The EMBO journal* **23**, 1133-1143.
- Sudprasert, W., Navasumrit, P. & Ruchirawat, M. (2006).** Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *Int J Hyg Environ Health* **209**, 503-511.

- Swanson, B. N. (2002).** Delivery of high-quality biomarker assays. *Disease markers* **18**, 47-56.
- Swartz, H. M., Flood, A. B., Gougelet, R. M., Rea, M. E., Nicolalde, R. J. & Williams, B. B. (2010).** A critical assessment of biodosimetry methods for large-scale incidents. *Health physics* **98**, 95-108.
- Taub, D. D. (2004).** Cytokine, growth factor, and chemokine ligand database. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]* **Chapter 6**, Unit 6 29.
- Taylor, W. R. & Stark, G. R. (2001).** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-1815.
- Terzoudi, G. I. & Pantelias, G. E. (2006).** Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiation protection dosimetry* **122**, 513-520.
- Thierens, H., Vral, A., Barbe, M., Aousalah, B. & De Ridder, L. (1999).** A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutation research* **445**, 105-111.
- Tomita, M. (2010).** Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. *Journal of radiation research* **51**, 493-501.
- Tubiana, M., Feinendegen, L. E., Yang, C. & Kaminski, J. M. (2009).** The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. *Radiology* **251**, 13-22.
- Turttoi, A., Brown, I., Oskamp, D. & Schneeweiss, F. H. (2008).** Early gene expression in human lymphocytes after gamma-irradiation-a genetic pattern with potential for biodosimetry. *International journal of radiation biology* **84**, 375-387.
- Turttoi, A., Brown, I., Schlager, M. & Schneeweiss, F. H. (2010).** Gene expression profile of human lymphocytes exposed to (211)At alpha particles. *Radiation research* **174**, 125-136.
- Tweddle, D. A., Pearson, A. D., Haber, M., Norris, M. D., Xue, C., Flemming, C. & Lunec, J. (2003).** The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer letters* **197**, 93-98.
- Vilasova, Z., Rezacova, M., Vavrova, J., Tichy, A., Vokurkova, D., Zoelzer, F., Rehakova, Z., Osterreicher, J. & Lukasova, E. (2008).** Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. *Acta biochimica Polonica* **55**, 381-390.
- Vilenchik, M. M. & Knudson, A. G., Jr. (2000).** Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5381-5386.
- Vogt, J., Morgan, N. V., Marton, T., Maxwell, S., Harrison, B. J., Beeson, D. & Maher, E. R. (2009).** Germline mutation in DOK7 associated with fetal akinesia deformation sequence. *J Med Genet* **46**, 338-340.

- Vral, A., Thierens, H. & De Ridder, L. (1997).** In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes. *International journal of radiation biology* **71**, 61-68.
- Vral, A., Fenech, M. & Thierens, H. (2011).** The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis* **26**, 11-17.
- Wakeford, R. (2004).** The cancer epidemiology of radiation. *Oncogene* **23**, 6404-6428.
- Wang, G. Q., Gastman, B. R., Wieckowski, E. & other authors (2001).** A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs. *The Journal of biological chemistry* **276**, 34307-34317.
- Wang, Q., Chen, Y., Xie, F., Ge, Y., Wang, X. & Zhang, X. (2009).** A novel agonist anti-human OX40L monoclonal antibody that stimulates T cell proliferation and enhances cytokine secretion. *Hybridoma (Larchmt)* **28**, 269-276.
- Ward, J. F. (1988).** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **35**, 95-125.
- Warmerdam, D. O., Freire, R., Kanaar, R. & Smits, V. A. (2009).** Cell cycle-dependent processing of DNA lesions controls localization of Rad9 to sites of genotoxic stress. *Cell Cycle* **8**, 1765-1774.
- Waselenko, J. K., MacVittie, T. J., Blakely, W. F. & other authors (2004).** Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Annals of internal medicine* **140**, 1037-1051.
- Wei, Y. H. (1998).** Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* **217**, 53-63.
- Wilkins, R. C., Wilkinson, D., Maharaj, H. P., Bellier, P. V., Cybulski, M. B. & McLean, J. R. (2002).** Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells. *Mutation research* **513**, 27-36.
- Wilkins, R. C., Romm, H., Oestreicher, U., Marro, L., Yoshida, M. A., Suto, Y. & Prasanna, P. G. (2011).** Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay - Further validation of International Networking. *Radiation measurements* **46**, 923-928.
- Wu, H. & Leng, R. P. (2011).** UBE4B, a ubiquitin chain assembly factor, is required for MDM2-mediated p53 polyubiquitination and degradation. *Cell Cycle* **10**, 1912-1915.
- Wu, X. & Deng, Y. (2002).** Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7**, d151-156.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. (1980).** Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* **68**, 251-306.

- Yoshikiyo, K., Kratz, K., Hirota, K., Nishihara, K., Takata, M., Kurumizaka, H., Horimoto, S., Takeda, S. & Jiricny, J. (2010).** KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21553-21557.
- Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Koyama, Y., Hirota, Y., Ayusawa, D., Seno, T., Garrett, C. & Wataya, Y. (1987).** Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *The Journal of biological chemistry* **262**, 8235-8241.
- Yu, J., Marsh, S., Ahluwalia, R. & McLeod, H. L. (2003).** Ferredoxin reductase: pharmacogenomic assessment in colorectal cancer. *Cancer research* **63**, 6170-6173.
- Yu, J. & Zhang, L. (2008).** PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S71-83.
- Yuen, S. W., Chui, A. H., Wilson, K. J. & Yuan, P. M. (1989).** Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins. *Biotechniques* **7**, 74-83.
- Yusuf, I. & Fruman, D. A. (2003).** Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends in immunology* **24**, 380-386.
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C. & Fornace, A. J., Jr. (1999).** Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**, 2892-2900.
- Zhang, W., Carriquiry, A., Nettleton, D. & Dekkers, J. C. (2007).** Pooling mRNA in microarray experiments and its effect on power. *Bioinformatics* **23**, 1217-1224.
- Zhao, J. (2004).** Coordination of DNA synthesis and histone gene expression during normal cell cycle progression and after DNA damage. *Cell Cycle* **3**, 695-697.
- Zhao, Y., Biertumpfel, C., Gregory, M. T., Hua, Y. J., Hanaoka, F. & Yang, W. (2012).** Structural basis of human DNA polymerase ϵ -mediated chemoresistance to cisplatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7269-7274.
- Zhou, B. B. & Elledge, S. J. (2000).** The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.
- Ziegler, G. A., Vonnrhein, C., Hanukoglu, I. & Schulz, G. E. (1999).** The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis. *Journal of molecular biology* **289**, 981-990.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999).** An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* **274**, 11549-11556.
- Zou, X., Li, X., Liu, J., Lian, Z., Fan, R., Du, R., Xie, H., Song, J. & Fan, D. (2006).** Preparation and characterization of a specific monoclonal antibody against a new gene product: URG11. *Hybridoma (Larchmt)* **25**, 378-381.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Darstellung der direkten und indirekten Wirkung IR auf die DNA
- Abb. 2:** Analyse dizentrischer Chromosomen in der Metaphasen
- Abb. 3:** Darstellung einer binukleären Zelle mit Mikrokern
- Abb. 4:** Darstellung eines auf Genexpressionen basierenden biodosimetrischen Assays
- Abb. 5:** Induktion der zellulären Schadensantwort nach Einwirkung IR
- Abb. 6:** Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der P53-vermittelten Apoptose
- Abb. 7:** Schematische Darstellung der aufgetrennten Blutkomponenten
- Abb. 8:** Schematische Darstellung der *Microarray*-Präparation
- Abb. 9:** *Dot-Plot* einer durchflusszytometrischen Messung von mit Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-markierten Lymphozyten
- Abb. 10:** Schematische Darstellung der Auswertung zur Identifizierung von Dosisindikatorgenen nach Bestrahlung
- Abb. 11:** Darstellung vitaler-, früh- und spät-apoptotischer Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung
- Abb. 12:** Kapillarelektrophoretische Darstellung und Analyse der RNA-Isolate mittels Mikrofluidik-System
- Abb. 13:** Darstellung der 6 h nach Bestrahlung induzierten Signalwege
- Abb. 14:** Darstellung der 24 h nach Bestrahlung induzierten Signalwege
- Abb. 15:** Darstellung der 48 h nach Bestrahlung induzierten Signalwege
- Abb. 16:** Anzahl der den verschiedenen Signalwegen zugeordneten und signifikant veränderten Gene
- Abb. 17:** Darstellung des P53-Signalwegs
- Abb. 18:** Darstellung des Systemischen Lupus erythematosus Signalwegs
- Abb. 19:** Darstellung der Antigenprozessierung und -präsentation
- Abb. 20:** Expressionsanalysen der Gene *HIST1H2AL* und *HIST1H4A*
- Abb. 21:** Agarosegel zur Überprüfung der Spezifität der *Primer* für qRT-PCR-Messungen
- Abb. 22:** Relative Genexpressionen von Markergenen für die Biodosimetrie in gepoolten RNA-Proben
- Abb. 23:** Relative Genexpressionen von Markergenen für die Biodosimetrie in nicht-gepoolten Proben
- Abb. 24:** Vergleich der Expressionsprofile von fünf Markergenen detektiert mittels *Microarrays* und in qRT-PCR-Messungen
- Abb. 25:** Immunologischer Nachweis von TNFSF4 in Lymphozyten 6 (a), 24 (b) und 48 h (c) nach Bestrahlung (exemplarische Blots)
- Abb. 26:** Immunologischer Nachweis von FDXR in Lymphozyten 6 (a), 24 (b) und 48 h (c) nach Bestrahlung (exemplarische Blots)
- Abb. 27:** Immunologischer Nachweis von FDXR in Lymphozyten 6 (a), 24 (b) und 48 h (c) nach Bestrahlung und Translationshemmung mit Cycloheximid (CHX; exemplarische Blots).
- Abb. 28:** Darstellung der vitalen-, früh- und spät-apoptotischen Lymphozyten nach Inkubation mit 4-Acetamidophenol (A) und Mitomycin C (M)
- Abb. 29:** Relative Genexpressionen nach 4-Acetamidophenol (A) und Mitomycin C (M) Exposition
- Abb. 30:** Darstellung vitaler-, früh- und spät-apoptotischer Lymphozyten nach Niedrigdosisbestrahlung

Abb. 31: Relative Expressionen von *FDXR*, *LY6G5C* und *PFKFB3* nach Niedrigdosisbestrahlung

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Dosisabhängige Erscheinungsformen der Strahlenkrankheit (modifiziert nach Waselenko *et al.*, 2004; KMS: Knochenmarkschädigung; GIS: Gastrointestinales Syndrom)

Tab. 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten *Primer*

Tab. 3: Alter und Geschlecht der initialen Blutspender

Tab. 4: Übersicht über die Spender der nicht-gepoolten RNA-Proben

Tab. 5: QRT-PCR Bedingungen

Tab. 6: Standard-PCR Bedingungen

Tab. 7: Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamidgelen (die Mengenangaben gelten für zwei Gele)

Tab. 8: Signifikant veränderte Gene zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung

Tab. 9: Markergene für Dosiszuordnungen nach Hochdosisbestrahlung basierend auf der Selektionshäufigkeit (modifiziert nach Boldt *et al.*, 2012; rot markierte Gene wurde in weitere Experimente eingesetzt)

Tab. 10: Vorhersagegenauigkeit der einzelnen Strahlendosen nach Selektion geeigneter Markergene (modifiziert nach Boldt *et al.*, 2012)

Tab. 11: Proteinmengen von TNFSF4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (angegeben sind die relativen Proteinmengen von vier Spendern im Vergleich zur Kontrolle)

Tab. 12: Proteinmengen von FDXR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (angegeben sind die relativen Proteinmengen von vier Spendern im Vergleich zur Kontrolle; * $p < 0,05$)

Tab. 13: Proteinmengen von FDXR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation mit Cycloheximid (CHX; angegeben sind die relativen Proteinmengen von drei Spendern im Vergleich zur Kontrolle)

Tab. 14: Markergene für Dosiszuordnungen nach Niedrigdosisbestrahlung basierend auf der Selektionshäufigkeit (modifiziert nach Knops *et al.*, 2012; rot markierte Gene wurde in weitere Experimente eingesetzt)

Tab. 15: Sensitivität und Spezifität der Dosisabschätzung im Niedrigdosisbereich (modifiziert nach Knops *et al.*, 2012)

Tab. 16: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen dem Zellzyklus zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Tab. 17: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen dem P53-Signalweg zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Tab. 18: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen dem Systemischen Lupus erythematodes Signalweg zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Tab. 19: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Tab. 20: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen der Antigenprozessierung und -präsentation zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Tab. 21: Log₂ Expressionswerte der 16 für die Hochdosisbestrahlung identifizierten Markergene detektiert mittels *Microarrays*

Tab. 22: Log₂ Expressionswerte der neun für die Niedrigdosisbestrahlung identifizierten Markergene detektiert mittels *Microarrays*

8.3 Tabellen der Genexpressionsänderungen signifikant veränderter Gene

Tab. 16: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen dem Zellzyklus zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Gene	Zellzyklus											
	6 h				24 h				48 h			
	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
<i>CDKN1A</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				
<i>CDKN2D</i>								x				
<i>CYCLIN D1</i>	x	x	x	x								
<i>E2F5</i>		x	x	x		x	x	x				
<i>GADD45A</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				
<i>MAD1L1</i>						x	x	x				
<i>MDM2</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				
<i>MYC</i>					x	x	x	x				
<i>PCNA</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				
<i>RBL2</i>					x	x	x	x				

Tab. 17: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen dem P53-Signalweg zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Gene	P53-Signalweg											
	6 h				24 h				48 h			
	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
<i>ATM</i>											x	x
<i>BAX</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>BBC3</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>CDKN1A</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>CYCLIN D1</i>	x	x	x	x								
<i>CYCLIN G1</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>CYCLIN G2</i>						x	x	x				
<i>DDB2</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>EI24</i>					x	x	x	x				
<i>FAS</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>GADD45A</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>IGFBP-3</i>												x
<i>LRDD</i>						x	x	x				
<i>MDM2</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>PERP</i>	x	x	x	x								
<i>PPM1D</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				
<i>SESTRIN1</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>SESTRIN2</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				
<i>TNFSRF10B</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>TP53I3</i>									x	x	x	x
<i>ZMAT3</i>					x	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 18: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen dem Systemischen Lupus erythematoses Signalweg zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; p < 0,01 nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Systemsicher Lupus erythematoses Signalweg												
Gene	6 h				24 h				48 h			
	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
C3											X	X
C7					X	X	X	X	X	X	X	X
CD40			X	X								
CD40LG											X	X
FCGR2B			X	X								
HIST1H2AB					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2AD					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2AL					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2AJ						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BB						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BC						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BD						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BH						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BJ					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BL						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H2BM							X	X	X	X	X	X
HIST1H2BN							X	X	X	X	X	X
HIST1H2BO						X	X	X	X	X	X	X
HIST1H4A					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST2H2AB					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST2H2BE						X	X	X	X	X	X	X
HIST3H2A					X	X	X	X	X	X	X	X
HIST3H2BB						X	X	X	X	X	X	X
HLA-DQA1			X	X								
HLA-DOB			X	X						X	X	X
IFNG									X	X	X	X

Tab. 19: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; $p < 0,01$ nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Gene	Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion											
	6 h				24 h				48 h			
	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
CD27												x
CD70	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CD40	x	x	x	x								
CD40LG											x	x
CCL5								x		x	x	x
CCL17			x	x								
CCL27							x	x		x	x	x
CCR5					x	x	x	x				
CX3CR1							x	x	x	x	x	x
CXCL2										x	x	x
CXCL3										x	x	x
CXCL16					x	x	x	x				
CXCR4							x	x	x	x	x	x
EDAR												x
FAS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
FASLG							x	x	x	x	x	x
IFNG									x	x	x	x
IFNGR2										x	x	x
IL21R					x	x	x	x				
IL18R1					x	x	x	x	x	x	x	x
IL18RAP							x	x	x	x	x	x
IL2RB							x	x		x	x	x
IL12RB2						x	x	x		x	x	x
OSM						x	x	x		x	x	x
PLEKHQ1											x	x
TGFBR2											x	x

8 Anhang

<i>TNFSF4</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>TNFSF8</i>					X	X	X	X	X	X	X	X
<i>TNFSF9</i>	X	X	X	X								
<i>TNFRSF17</i>										X	X	X
<i>TNFRSF10B</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>TNFRSF10C</i>									X	X	X	X
<i>TNFRSF10D</i>					X	X	X	X				
<i>TNFRSF13C</i>		X	X	X								
<i>XCL1</i>					X	X	X	X	X	X	X	X
<i>XCL2</i>					X	X	X	X	X	X	X	X

Tab. 20: Signifikant veränderte Gene, die bei den Signalweganalysen der Antigenprozessierung und –präsentation zugeordnet wurden (x: signifikant hochregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; x: signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; p < 0,01 nach Fallzahlkorrektur nach Benjamini & Hochberg über alle ausgewerteten Datenpunkte)

Gene	Antigenprozessierung- und präsentation											
	6 h				24 h				48 h			
	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
<i>CALR</i>									x	x	x	x
<i>CD8A</i>											x	x
<i>CTSL1</i>									x	x	x	x
<i>HLA-DOB</i>										x	x	x
<i>HLA-G</i>										x	x	x
<i>KIR2DL1</i>										x	x	x
<i>KIR2DL4</i>									x	x	x	x
<i>KIR2DL5A</i>										x	x	x
<i>KIR2DS1</i>						x	x	x		x	x	x
<i>KIR2DS2</i>						x	x	x		x	x	x
<i>KIR3DL1</i>							x	x		x	x	x
<i>KIR3DL2</i>							x	x		x	x	x
<i>KLRC1</i>						x	x	x	x	x	x	x
<i>KLRC2</i>						x	x	x		x	x	x
<i>KLRC3</i>						x	x	x	x	x	x	x
<i>KLRC4</i>							x	x	x	x	x	x
<i>KLRD1</i>						x	x	x	x	x	x	x

Tab. 21: Log₂ Expressionswerte der 16 für die Hochdosisbestrahlung identifizierten Markergene detektiert mittels *Microarrays*

Gene	Log ₂ Expressionsänderung											
	6 h				24 h				48 h			
	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	0,5 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
<i>FDXR</i>	2,644	3,106	3,616	3,956	2,892	3,335	3,903	4,510	2,684	2,986	3,5	3,828
<i>TNFSF4</i>	0,984	1,480	1,970	2,652	1,293	1,816	2,505	3,507	1,429	2,193	2,801	3,078
<i>PHLDA3</i>	2,215	2,540	3,077	3,395	2,384	3,022	3,742	4,190	2,082	2,417	3,019	3,358
<i>VWCE</i>	0,737	1,361	1,831	2,241	1,386	2,094	3,241	4,323	1,731	2,527	3,597	4,603
<i>SPATA18</i>	1,604	1,980	2,275	2,542	2,558	3,105	3,691	4,274	2,460	3,577	3,951	4,412
<i>DOK7</i>	-0,681	-1,206	-1,710	-2,477	-0,850	-1,396	-1,972	-2,603	-1,553	-2,071	-3,123	-4,358
<i>LGR6</i>	2,871	3,535	4,480	5,096	2,087	2,933	3,694	4,745	2,485	3,338	4,052	4,455
<i>PRICKLE1</i>	-0,393	-1,042	-1,992	-2,837	-0,553	-1,036	-1,598	-2,116	-1,145	-1,464	-2,540	-3,353
<i>RP4-742C19.3</i>	0,450	0,659	0,949	1,281	1,578	2,003	2,550	3,233	1,896	2,310	3,051	3,749
<i>ISG20L1</i>	1,892	1,967	2,171	2,379	2,013	2,255	2,374	2,643	1,768	1,983	2,067	2,042
<i>LOC283454</i>	-0,738	-1,114	-1,701	-2,661	-0,691	-1,263	-2,049	-3,106	-1,218	-1,659	-2,480	-3,195
<i>TCL1A</i>	-0,485	-0,8	-1,251	-1,848	-0,616	-1,046	-1,441	-2,374	-1,174	-1,789	-2,495	-3,665
<i>THC2651023</i>	-0,840	-1,148	-1,925	-2,786	-0,802	-1,552	-2,311	-3,179	-1,098	-1,663	-1,951	-2,344
<i>CNTNAP2</i>	-0,466	-0,805	-1,146	-1,320	-3,571	-3,893	-4,607	-5,732	-1,241	-1,857	-2,623	-3,840
<i>C8orf38</i>	1,524	1,495	1,937	2,085	2,079	2,630	3,221	3,519	2,139	2,630	2,975	2,937
<i>E2F7</i>	0,230	0,293	0,543	0,887	1,055	1,785	2,666	3,510	1,158	1,7	2,266	2,889

Tab. 22: Log₂ Expressionswerte der neun für die Niedrigdosisbestrahlung identifizierten Markergene detektiert mittels *Microarrays*

Log₂ Expressionsänderung				
Gene	24 h		48 h	
	0,02 Gy	0,1 Gy	0,02 Gy	0,1 Gy
<i>THC2535753</i>	0,516	0,678	0,546	0,642
<i>MKL2</i>	0,287	0,401	0,39	0,422
<i>FDXR</i>	0,07	0,151	0,098	0,138
<i>C10orf39</i>	0,31	0,401	0,379	0,401
<i>PFKFB3</i>	0,189	0,275	0,299	0,275
<i>A_32_P138939</i>	0,138	0,239	0,287	0,263
<i>FLJ35379</i>	0,345	0,496	0,485	0,516
<i>BU561469</i>	0,111	0,151	0,176	0,176
<i>LY6G5C</i>	0,239	0,322	0,287	0,263

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Katja Knops
Geb. am 09.03.1984 in Tönisvorst
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Dionysiusstr. 145
47798 Krefeld
Tel.: 01516/1516935
E-Mail-Adresse: katja.knops@gmx.de

Schulische und akademische Ausbildung

Oktober 2008 – Mai 2012	Promotionsstudium an der Universität Duisburg-Essen, in der AG Strahlenbiologie im Forschungszentrum Jülich. Betreut durch Herrn Prof. Dr. George Iliakis <u>Thema:</u> Genexpressionsanalysen in humanen peripheren Blutlymphozyten nach Bestrahlung als Grundlage für biodosimetrische Applikationen. Förderung des Promotionsvorhabens durch ein Promotionsstipendium des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).
Oktober 2007 – September 2008	Diplomarbeit an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, am Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) im Forschungszentrum Jülich. Betreut durch Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger <u>Thema:</u> Eignung von Autotransportern zum Oberflächendisplay in Gram-negativen Bakterien. Note: „sehr gut“ (1,3)
Oktober 2003 – September 2008	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf Abschluss: Diplom
Juli 1994 – Juni 2003	Arndt-Gymnasium, Krefeld Abschluss: Abitur
Juli 1990 – Juni 1994	Grundschule Josefschule, Krefeld

Publikationen

Doktorarbeit:

Boldt S, Knops K, Kriehuber R, Wolkenhauer O. A frequency-based gene selection method to identify robust biomarkers for radiation dose prediction. International journal of radiation biology 88, 267-276, 2012

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Gene Expression in Low- and High-Dose-Irradiated Human Peripheral Blood Lymphocytes: Possible Applications for Biodosimetry, Radiation Research, accepted

Vortrag:

Knops K. Gene expression pattern analysis in human PBLs as a tool for radiation biodosimetry. EPRBioDose 2010

Diplomarbeit:

Troeschel SC, Thies S, Link O, Real CI, Knops K, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE. Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*, Journal of Biotechnology 161, 71-79, 2012

Posterpräsentationen:

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Gene expression pattern analysis as a tool for radiation biodosimetry. 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Abstract book, p. 55, 2009

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Gene expression pattern analysis in human PBLs as a tool for radiation biodosimetry. 12th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Abstract book, p. 130, 2009

Boldt S, Knops K, Kriehuber R, Wolkenhauer O. Expression Signatures Functioning as Radiation Biodosimeters. German Conference of Bioinformatics, Abstract book, p. 121, 2009

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Radiation responsive genes in human lymphocytes as a tool for radiation biodosimetry. 13th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Abstract book, p. 28, 2010

Boldt S, Knops K, Kriehuber R, Wolkenhauer O. A p-value and fold-change-driven gene selection method for radiation dose prediction. EPRBioDose 2010, Abstract book, p. 193, 2010

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Identification of radiation-specific gene expression changes in human PBL after *ex vivo* irradiation suitable for biodosimetric applications. 14th International Congress of Radiation Research 2011, Abstract book, p. 84, 2011

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Radiation-specific gene expression changes in human PBL after *ex vivo* irradiation suitable for radiation biodosimetry. 14th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Abstract book, p. 95, 2011

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Time-dependent gene expression analysis in human peripheral blood lymphocytes for biodosimetric applications after low and high dose gamma-irradiation. 13th International Congress of the Radiation Protection Association, Abstract book, p. 76, 2012

Besondere Kenntnisse und Fähigkeiten

Sprachkenntnisse:	Englisch fließend in Wort und Schrift Französisch Grundkenntnisse
EDV:	Microsoft Word, Excel, PowerPoint Genespring Clone Manager
Arbeitstechniken:	Durchflusszytometrie <i>In vitro</i> Expression Isolierung und Kultivierung von humanen peripheren Blutlymphozyten Mikrobiologische Techniken Molekularbiologische Techniken Präparation und Auswertung von DNA-Microarrays RT-PCR (real-time PCR) Western Blot Zellkulturtechniken
Sonstiges:	Anfertigung von Zwischen- und Endberichten für Drittmittelgeber Anfertigung wissenschaftlicher Anträge Fortbildung in RT-PCR (real-time PCR) Vorträge und Postervorträge in englischer und deutscher Sprache Wissenschaftliche Betreuung von Praktikanten und Auszubildenden

Hobbies

Acrylmalerei, Fitnesstraining, Fußball, Kochen

Krefeld, den 01.09.2012

10 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Genexpressionsanalysen in humanen peripheren Blutlymphozyten nach Bestrahlung - Grundlagen für biodosimetrische Applikationen*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Katja Knops befürworte.

Essen, den _____

Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen	Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
--	---

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in